

Die "subsurface cisterns"

an der Pinealocytenmembran von *Meriones unguiculatus* (Cricetidae)
unter natürlichen und experimentellen Bedingungen

Ilse Tutter

München, März 1989





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0072

Die "subsurface cisterns"

an der Pinealozytenmembran von *Meriones unguiculatus* (Cricetidae)
unter natürlichen und experimentellen Bedingungen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie an der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Ilse Tutter

aus

München

München, März 1989

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Neuweiler

2. Berichterstatter: PD Dr. D. Weiss

Sonderberichterstatter: Prof. Dr. Th. Heinzeller

Tag der mündlichen Prüfung: 8.8.1989

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	Pinealorgan.....	1
1.2	"Subsurface cisterns".....	7
1.3	Kalzium als Botenstoff.....	10
1.4	Ziel der Arbeit.....	12
2.	Material und Methoden	
2.1	Zucht und Haltung der Versuchstiere.....	13
2.2	Tagesgang und operative Eingriffe.....	14
2.2.1	Diurnale Veränderungen	14
2.2.2	Bilaterale Exstirpation des Ganglion cervicale superius.....	14
2.2.3	Kastration und Substitution mit Testosteronpropionat...14	
2.3	Fixierung und Aufbereitung der Proben für TEM-Arbeiten.....	15
2.4	Morphometrische Auswertung.....	18
2.5	Statistik.....	19
2.6	Computergestützte 3D-Rekonstruktion der ssc.....	19
2.7	Gefrierbruch.....	22
2.8	Histochemischer Nachweis von Kalzium	
2.8.1	Komplexbildung mit Osmium-Blutlaugensalz.....	23
2.8.2	Nachweis der ATP-abhängigen Ca^{2+} -Akkumulation der ssc.....	23
2.8.3	Lokalisation von Kalzium mit Pyroantimonat.....	26
2.8.4	Diurnale Veränderung in der intrazellulären Ca^{2+} -Verteilung.....	27
2.8.5	Einfluß von Dantrolen-Natrium.....	27
3.	Ergebnisse	
3.1	Morphologie der "subsurface cisterns"	
3.1.1	Ultradünnschnitte.....	35
3.1.2	Gefrierbruch.....	39
3.1.3	Computergestützte 3D-Rekonstruktion.....	39
3.2	Experimente.....	51

3.2.1	Diurnale Veränderungen.....	56
3.2.2	Bilaterale Exstirpation des Ganglion cervicale superius.....	62
3.2.3	Kastration und Substitution mit Testosteronpropionat...	64
3.3	Histochemischer Nachweis von Kalzium	
3.3.1	Komplexbildung mit Osmium-Blutlaugensalz im Pineale....	64
3.3.2	ATP-abhängige Ca^{2+} -Akkumulation in den ssc.....	68
3.3.3	Kalziumlokalisation mit Pyroantimonat.....	68
3.3.4	Diurnale Veränderung in der intrazellulären Ca^{2+} -Verteilung.....	78
3.3.5	Einfluß von Dantrolen-Natrium.....	86
4.	Diskussion	
4.1	Morphologie.....	87
4.2	Inkonstanz der ssc der Pinealozyten.....	94
4.3	Hypothese zum Auf- und Abbau pinealer ssc.....	95
4.4	Mögliche Funktionen der ssc.....	99
4.5	Circadiane Rhythmen.....	103
4.6	Ssc nach der Ausschaltung von stimulierenden Einflüssen.....	105
5.	Zusammenfassung.....	108
6.	Literaturverzeichnis.....	109

1. Einleitung

1.1 Pinealorgan

Morphologie und Lage

Das Pinealorgan (Zirbeldrüse, Epiphysis cerebri) ist ein unpaares, zapfenförmiges Organ (der Name leitet sich von lateinisch "pinus" ab), das sich im Dach des III. Ventrikels befindet. Es entsteht als Ausstülpung des Diencephalon und liegt zwischen der Commissura habenularum und Commissura posterior und kommt in variabler Ausgestaltung in allen Wirbeltierklassen vor. Bei Meriones besteht das Organ aus einem proximalen Anteil, der an den Ventrikel grenzt und über den Pinealstiel mit dem distalen Hauptteil verbunden ist (Abb. 1). In den drei Kompartimenten sind ultrastrukturelle und funktionelle Unterschiede vorhanden (Welker & Vollrath, 1985), die vorliegende Untersuchung beschränkt sich auf den distalen Teil, das eigentliche Pineale.

Erste Hinweise auf das Pinealorgan stammen (nach Galenos) vom ägyptischen Anatomen Herophilos (3. vorchristliches Jahrhundert), Descartes (1596 - 1650) hielt es für ein psychomotorisches Zentrum. Auch heute ist die Bedeutung dieses Organes noch keineswegs vollständig geklärt.

Pineale als Licht-abhängiges Organ

Phylogenetisch betrachtet stammt das Pinealorgan (wie das Parietalorgan) von zusätzlichen dorsalen Augenanlagen ab, die schon bei Teleosteen ein "drittes Auge" bilden. Bei vielen rezenten Amphibien und Sauropsiden sind Pinealzellen noch lichtempfindlich und können direkt durch transparente Stellen im Schädeldach photisch stimuliert werden.

Während der Phylogenese entwickelten sich die pinealen Sinneszellen zu endokrinen Pinealozyten um. Dabei erfolgte ein sukzessiver Verlust der Rezeptororganellen (Übergänge können bei rezenten Wirbeltieren beobachtet werden), verbunden mit dem Verlust der direkten Lichtempfindlichkeit (Pévet & Collin, 1976). Die Ableitung von einer Sinneszelle ist an persistierenden Antigen-Eigenschaften der Säuger-Pinealozyten noch zu erkennen, z.B. an der

Abb. 1.

Lage des Pinealorganes bei *Meriones unguiculatus*.

Ein schematisierter Mediosagittalschnitt (links rostral) legt das Organ frei. Es liegt auf der Vierhügelplatte (LQ) und unter dem Confluens sinuum (CS) bzw. der Vena cerebri magna. Das trommelschlegelförmige Organ besteht aus drei Anteilen: ein tiefer Anteil kontaktiert den III. Ventrikel im Recessus pinealis (Pfeilkopf); er ist über einen dünnen Stiel mit dem ventrikelfernen Hauptteil (P) verbunden. Der Spalt in P und der anschließende Pfeil symbolisieren die Entnahme der Organquerschnitte (vgl. Abb. 2.).

Cb = Cerebellum, CC = Corpus callosum.

(aus: Heinzeller, Tutter und Aschauer, 1988)

Abb. 2.

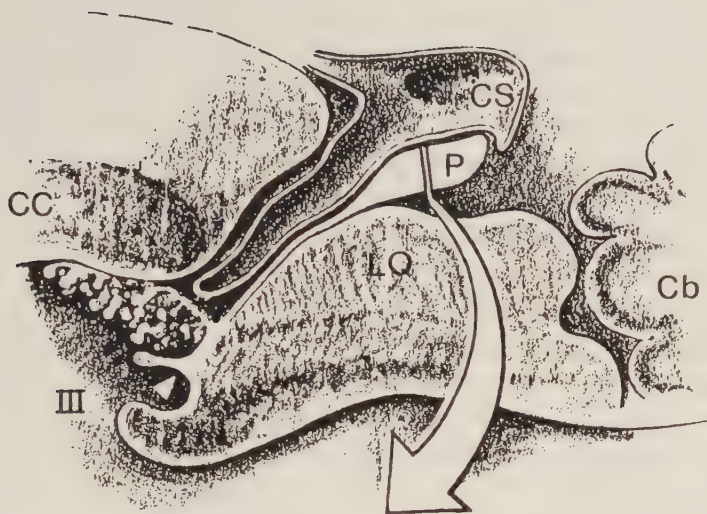
Semidünner Querschnitt durch ein Pinealorgan.

Der histologisch sehr einheitlich aufgebaute Zellverband ist von zahlreichen Vakuolen durchbrochen, die z.T. Kalkkonkretionen (Acervuli) enthalten. Piales Bindegewebe findet sich in geringen Mengen an der Organoberfläche und zirkumvaskulär.

K = Kapillare (Pfeile)

Schnittdicke 1 μm , Toluidinblau-Färbung.

Der Balken entspricht 100 μm .



immunhistochemischen Nachweisbarkeit von retinalem S-Antigen (Collin, 1971). Die Information über die Beleuchtungsverhältnisse der Umwelt erfolgt sekundär über retinale Fasern und eine komplexe Neuronenkette. Retinale Afferenzen ziehen zum Nu. supra-chiasmaticus (in diesem Zentrum werden Schrittmacherzellen angenommen, die die Funktion eines übergeordneten circadianen "Zeitgebers" haben; Übersicht bei Armstrong et al., 1986). Von dort erreicht die Licht-Information über verschiedene Stationen des Hirnstammes das thorakale Rückenmark und schließlich den Grenzstrang des Sympathikus. Von dessen oberstem Ganglion (Ganglion cervicale superius, GCS) nehmen die Nervi conarii ihren Ausgang, die extracerebral durch das Foramen magnum das Pinealorgan erreichen (Moore, 1978). Diese Nervenfasern stimulieren über adrenerge Rezeptoren die Syntheseleistungen der Pinealozyten (nachts, wenn die photische Aktivierung inhibitorischer Interneurone entfällt) und koppeln so die circadiane Aktivitätsrhythmik des Pinealorgans an den realen Tagesgang. Auf Grund der Versorgung durch den Sympathikus nimmt das Pineale eine Sonderstellung im Gehirn ein (Ito et al., 1988); in diesem Zusammenhang ist auch die stressabhängige Aktivierung des Pineale zu nennen (Heinzeller, 1985; Lynch & Deng, 1986; Heinzeller et al., 1988). Neben der sympathischen Versorgung über die Nervi conarii ist bei verschiedenen Säugerarten eine zentrale Innervierung des Pinealorgans gezeigt worden (Korf & Möller, 1984); ihre Bedeutung für die Stoffwechselaktivität des Pineale ist noch nicht bekannt. Im Laufe der Evolution ist also bei einem Lichtsinnesorgan an die Stelle der direkten Lichtreize eine neurale Afferenz ("photo-neuro...") getreten, an die Stelle einer neuritischen Efferenz die Bildung und Freisetzung von Hormonen ("...endocrine transducer").

Pineale als Hormon-Produzent

Das am besten untersuchte Pinealhormon ist Melatonin, ein fettlösliches Indolamin, das nach Stimulierung von adrenergen Rezeptoren der Pinealozytenmembran in mehreren enzymgesteuerten Syntheseschritten aus Tryptophan produziert wird.

Bei allen bisher untersuchten Tierarten erfolgt die Melatoninsyn-

these mit einer circadianen Rhythmik, wobei die Syntheserate in der Dunkelheit hoch und tagsüber niedrig ist (Reiter, 1980; Goldmann & Darrow, 1983). Das Hormon ist bei vielen nicht-tropischen Säugern entscheidend an der jahreszeitlichen Regulation des gonadalen Zustandes beteiligt (Arendt, 1984). Auch beim Menschen steht die Fähigkeit des Pineale zur Melatoninproduktion fest (Waldhauser & Steger, 1986), und zwar mit Schwankungen, die tages-, jahres- und oestruszyklisch verlaufen, sowie pubertätsbedingt sind (Arendt, 1986).

Das Hormon Melatonin wirkt vor allem auf das Hypothalamus-Hypophysen-System und reguliert damit die Aussendung glando- und gonadotroper Hormone (Cardinali, 1981). Endokrine Drüsen der Peripherie verfügen auch selbst über Melatonin-Rezeptoren. Die Sensitivität für das Hormon schwankt in einem diurnalen Rhythmus, womit eine Möglichkeit zur Modulation des Melatoninsignales besteht (Hong & Stetson, 1987).

Die Melatoninsynthese findet vermutlich frei im Zytosol und nicht an Organellen gebunden statt. Ferner wird angenommen, daß das niedermolekulare Hormon intrazellulär nicht gespeichert wird, sondern durch einfache Diffusion in den Blutkreislauf gelangt. Ein rückkoppelnder Einfluß des zirkulierenden Melatonins auf die Syntheseaktivität im Pinealorgan kann vermutet werden, da die Pinealozyten über hochaffine Bindungsstellen für Melatonin verfügen (Grota et al., 1980; Niles, 1983).

Im Pineale konnten mehrere Peptide, Proteine und Pteridine nachgewiesen werden (Übersicht bei Vollrath, 1981), über eine mögliche hormonelle Wirkung ist noch wenig bekannt. Die beobachteten, aber doch eher seltenen Exozytosevorgänge an den Pinealozytenmembranen könnten, im Gegensatz zur Abdiffusion von Melatonin, zur Ausschleusung dieser anderen Pinealprodukte dienen (Masson-Pévet et al., 1987).

Acervuli

Eine geradezu pinealtypische Bildung sind die sogenannten Acervuli ("Hirnsand"), die als Kolloidzysten entstehen, durch ständige Einlagerung von Hydroxyapatitkristallen anwachsen, schließlich durch das Absterben der umgebenden Zelle in den extra-

zellulären Raum gelangen und dort als große runde Kristallisationskeime weiter Kalzium anlagern (Reiter et al., 1976; Champney et al., 1985). Besonders viele Acervuli finden sich im Pineale von Meriones (Abb. 2) und Mensch. Dieser Inkrustationen wegen wurde das Pinealorgan beim Menschen lange für ein funktionsloses Rudiment gehalten; heute ist bekannt, daß das Pinealorgan in jeder Altersstufe zur Melatoninbildung fähig ist. Diese Kalkkonkretionen können nach neuerer Auffassung eher als Spuren vorangegangener Aktivität des Organes interpretiert werden (Lukaszyk & Reiter, 1975).

Zelltypen

Die vorherrschenden Zellen im Pineale sind die endokrin tätigen Pinealozyten, die phylogenetisch von der "Rezeptorlinie" abstammen (Collin, 1979); ihre Perikaryen besitzen einen oder mehrere zytoplasmatische Ausläufer, die ein eng verflochtenes Netzwerk ausbilden, manche entsenden auch Ausläufer in perikapillare Räume. Die Pinealozyten entsprechen in ihrer morphologischen Erscheinung paraganglionären Zellen. Die Ausstattung mit Organellen deutet auf rege Sekretionsprozesse (Abb. 3): ausgedehnter Golgi-Apparat, viel endoplasmatisches Retikulum (eR), Polyribosomen und verschiedene Vesikel. Auffällig sind die großen, gelappten Zellkerne mit ihren charakteristischen Nukleoli (Abb. 2 und 3). Daneben sind auch Gliozyten vorhanden, die sich durch randständiges Heterochromatin im Zellkern deutlich von den Pinealozyten abheben; ihrer funktionellen Bedeutung wurde bisher kaum Beachtung geschenkt. Ein dichtes Kapillarnetz durchsetzt das Organ (Abb. 2).

Kommunikation zwischen Pinealozyten

Über die Art und Weise der Kommunikation der Pinealozyten untereinander und der Synchronisation ihrer Syntheseleistung ist wenig bekannt. "Gap junctions" sind vorhanden, aber nicht sehr häufig (Taugner et al., 1981; eigene Beobachtungen), synaptische Verbindungen sind nur für die Beziehungen zu den adrenergen Axonen beschrieben und ausgesprochen selten (Huang & Lin, 1984). "Synaptic ribbons", denen eine Kommunikationsleistung (Vollrath, 1981)

zwischen benachbarten Zellen zugeschrieben wird, sind in Pinealozyten verschiedener Tierarten sehr häufig, nicht aber bei Meriones (Abb. 17 a).

Strukturen, die für eine Beteiligung an der Informationsvermittlung zwischen Pinealozyten in Frage kommen, sind die auffälligen und bei Meriones zahlreichen Zisternen unter der Pinealozytenmembran, die "subsurface cisterns" (ssc).

1.2 "Subsurface cisterns"

Unter ssc versteht man solche Teile des eR, die in Gestalt flacher Zisternen an das Plasmalemm herantreten (Abb. 3 und 4). Derartige Zisternen wurden zum ersten Mal bei einer Beschreibung der äußeren Haarzellen des Cortischen Organes erwähnt (Engström, 1958); den Begriff führte Rosenbluth (1962) ein, der auch das morphologische Erscheinungsbild definierte. Die ssc sind mit Variationen in einer Vielzahl von Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems, in sensorischen und auch in sekretorisch tätigen Zellen dokumentiert (Übersichten bei Rosenbluth, 1962; Takahashi & Wood, 1970; Le Beux, 1972).

In Pinealozyten von Rind und Schaf hat Anderson bereits 1965 ssc beschrieben, im Folgenden wurden sie bei verschiedenen anderen Säugern beobachtet (Übersicht bei Pevet, 1979); die Zisternen-Anschnitte zeigten eine einheitliche Erscheinung (Abb. 4): die zum Zellinneren weisende Membran trägt meist einen lockeren Besatz mit Ribosomen, der aber auch fehlen kann. Die äußere Membran ist stets glatt und hält zur Zellmembran einen konstanten Abstand von 15 nm. Der Durchmesser der ssc liegt bei 20 nm, die Gesamtlänge variiert beträchtlich und kann bis zu über einem Mikrometer betragen, nicht selten liegen ssc in benachbarten Pinealozyten einander genau gegenüber; Verbindungen zum übrigen eR der Zellen waren gelegentlich angeschnitten.

Trotz der weiten Verbreitung in verschiedenen Zelltypen und der zahlenmäßig beachtlichen Präsenz in den individuellen Zellen ist die funktionelle Bedeutung der ssc im allgemeinen weitgehend ungeklärt. Die hierzu entwickelten spekulativen Vorstellungen umfassen die Ausschleusung von Inkretstoffen, einen transzellulä-

Abb. 3.

Pinealozyt.

Anschnitt des zentralen, einem Perikaryon analogen Pinealozytenbereiches, allseitig umgeben von weiteren Pinealozyten. Der gelappte Kern mit dem prominenten Nukleolus ist ein charakteristisches Merkmal dieses Zelltyps. Der ausgedehnte Golgi-Apparat ist mehrfach getroffen, die zahlreichen Mitochondrien gehören dem Tubulus-Typ an. Auffällig viele "subsurface cisterns" (Pfeile) begleiten die Pinealozytenmembranen.

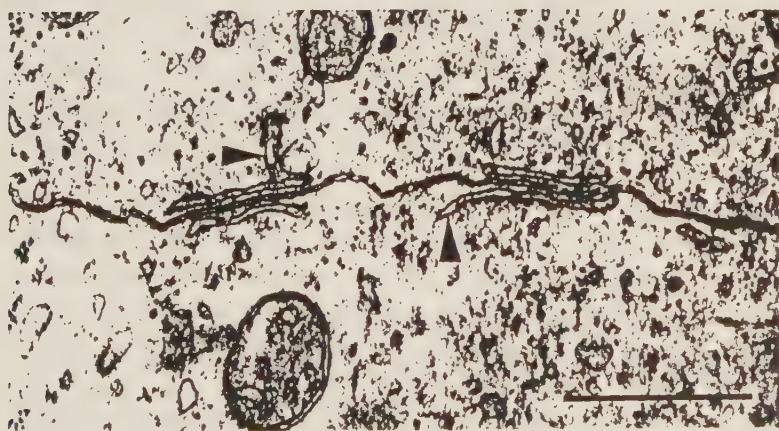
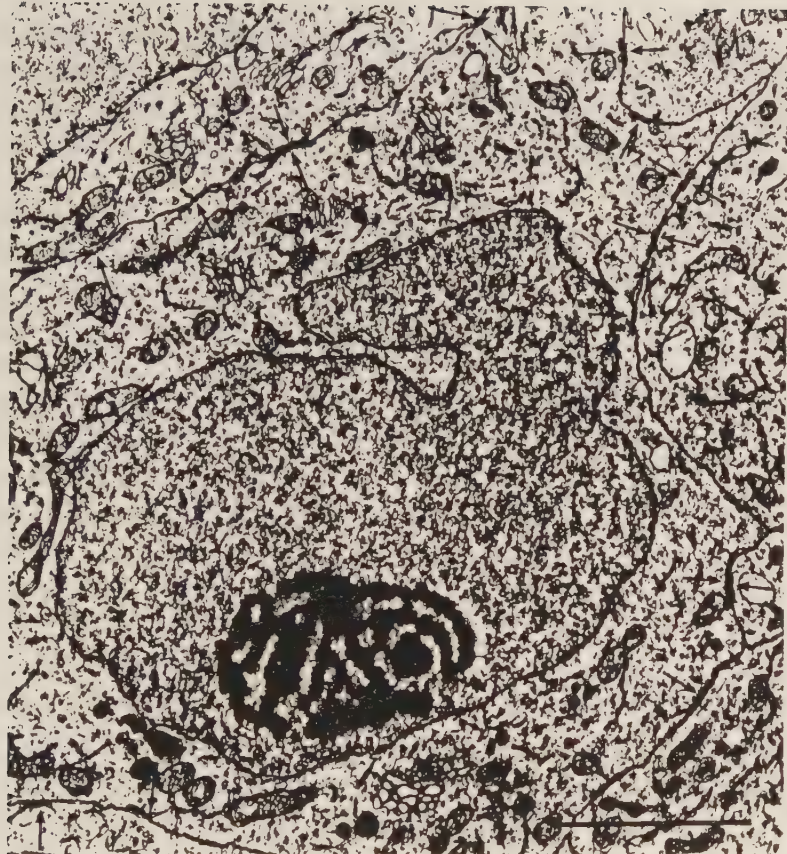
Der Balken entspricht 2 μm .

Abb. 4.

"Subsurface cisterns" (ssc).

Der Abstand der äußeren Zisternenmembran zum Plasmalemm ist ziemlich konstant (15 nm), ebenso der Abstand der beiden Zisternenmembranen voneinander. Nur die innere Membran kann Ribosomen tragen. Die Verbindung der ssc mit anderen eR-Anteilen ist an zwei Stellen (Pfeilköpfe) angedeutet. Häufig liegen, wie bei dem hier ausgewählten Beispiel, ssc in benachbarten Pinealozyten einander genau gegenüber.

Der Balken entspricht 0,5 μm .



ren Substanz Austausch (Rosenbluth, 1962; Hannah & Nathaniel, 1978; Furuse et al., 1982; Kolde & Themann, 1982), die Isolierung gegen zufällige Kommunikation (Tandler & Hoppel, 1974), ebenso wie die wechselseitige Beeinflussung des Membranpotentials (Le Beux, 1972).

Beim Pinealorgan deuten mehrere Untersuchungen auf eine Korrelation der Ausbildung von ssc mit dem Gonadotropinspiegel hin. Unter Versuchsbedingungen, die den Spiegel heben, wie direkte Applikation von Gonadotropinen (Karasek & Marek, 1978) oder Kastration (Karasek et al., 1978), sind im Pinealozyten vermehrt ssc zu finden. Versuchsbedingungen, die den Gonadotropinspiegel erfahrungsgemäß senken, wie Kurztag (Heinzeller & Schinko, 1979) oder sozialer Stress (Heinzeller, 1985), lassen weniger ssc an der Pinealozytenmembran entstehen. Ob diese Beispiele über eine Korrelation hinaus eine funktionelle Abhängigkeit belegen, ist angesichts des multifaktoriellen Systems der Gonadensteuerung noch offen.

Die einzige wirklich gesicherte Aussage zur Funktion der ssc ist, daß sie in Sympathikusganglien des Frosches (Fujimoto et al., 1980), ferner in Lichtrezeptoren von Bluteigel (Walz, 1982) und Frosch (Ungar et al., 1984) eine hohe Aufnahmefähigkeit für Ca^{2+} -Ionen besitzen. In Pinealozyten mit intakter Ultrastruktur konnte bisher kein Nachweis von Kalzium in Organellen geführt werden, die auf morphologisch stark veränderte Zellen beschränkten Befunde lassen eine Beteiligung der ssc am Kalziumhaushalt in Pinealozyten vermuten (Krstić, 1985).

1.3 Kalzium als Botenstoff

Freie Kalziumionen spielen nicht nur in Muskelzellen eine Rolle als Vermittler zwischen extrazellulärem Signal und der spezifischen Zellantwort (Kopplung von Erregung und Kontraktion), sondern entsprechend bei der Aktivierung von Neuronen (Blaustein, 1988) und bei der Stimulation von sezernierenden Zellen (Carafoli & Penniston, 1986; Wassermann, 1988).

Im Pinealorgan erfolgt die Aktivierung vor allem durch Noradrenalin. Adrenerge Rezeptoren in der Pinealozytenmembran vermitteln

diesen Stimulus an intrazelluläre Messengersysteme. Der Aktivierung dieser Rezeptoren folgt zunächst ein Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration im Bereich des Plasmalemm (Ho & Klein, 1987; Ho et al., 1987 und 1988), die Zellantwort ist also Kalzium-abhängig.

Wie die Aktivierung der Zelle kann auch ihre Reaktion an einen internen Anstieg der Kalziumkonzentration gebunden sein (Einstrom?, reduzierte Pumpleistung?, Freisetzung aus internen Speichern?). Das gilt für die Sekretion von Transmittern (Henkart et al., 1978) und Hormonen (Malaisse, 1988). Da aber Kalzium in bestimmten Konzentrationen als Zellgift wirkt, muß überschüssiges Kalzium schnellstmöglich wieder aus der Zelle gepumpt werden (auch gegen die extrazellulär 10.000 fach höhere Konzentration) und/oder in intrazelluläre Speicher aufgenommen werden (Campbell, 1983).

Rolle des eR in der Kalziumregulation

Die Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration erfolgt in den Muskelzellen durch das sarkoplasmatische Retikulum (Carafoli & Penniston, 1986), in Neuronen zum großen Teil durch das glatte eR (Henkart et al., 1976), auch für eine entscheidende Rolle des eR als Kalziumspeicher in allen rezeptorregulierten Zellen gibt es viele Hinweise (Somlyo, 1984; Rasmussen et al., 1984).

Diverse Eigenschaften des Pinealozyten (erregbare, inkretorische Zelle mit Ca^{2+} -abhängigen Messengern) postulieren ein leistungsfähiges Regelsystem für intrazelluläres Kalzium, einiges spricht für eine maßgebliche Beteiligung des eR, wobei den SSC aufgrund ihrer exponierten Lage eine Sonderstellung zukommen könnte.

1.4 Ziel der Arbeit

Nach dem Stand der Kenntnis über Pineale und ssc ergibt sich als Arbeitshypothese, daß die funktionelle Bedeutung von ssc

- in der Kommunikation zwischen Pinealozyten,
- in der Stimulierbarkeit der Pinealozytenmembran,
- in der Regulation des internen Kalziumspiegels liegen könnte.

Die vorliegende Arbeit versucht, durch die Klärung folgender Fragen, hierzu einen morphologischen Beitrag zu leisten:

- Wie sehen die ssc der Pinealozyten genau aus? Wie groß sind sie, welche Gestalt haben sie, gehört zu jeder ssc ein Pendant in der Nachbarzelle, welche Beziehung besteht zu anderen eR-Kompartimenten und zum Golgi-Apparat?
- Lassen sich ssc durch äußere Bedingungen, von denen eine starke Wirkung auf die Aktivität des Pinealorganes angenommen werden kann, beeinflussen, insbesondere durch Tageszeit und experimentelle Eingriffe wie Sympathektomie und massive Störung der Gonadensteuerung?
- Sind ssc Bestandteil des Kalzium-speichernden Systems? Wenn ja, ändert sich deren Kalziumgehalt mit den physiologischen Zuständen der Pinealozyten und läßt sich ihr Kalziumgehalt beeinflussen?

2. Material und Methoden

2.1 Zucht und Haltung der Versuchstiere

Die Arbeit wurde an adulten Mongolischen Rennmäusen, *Meriones unguiculatus*, Milne-Edwards, (1871) durchgeführt. Alle Tiere wurden selbst gezüchtet. Für rein deskriptive Vorhaben (2.6 - 2.8) wurden erwachsene Tiere beiderlei Geschlechts verwendet, für alle Experimente, die eine quantifizierende Auswertung einschliessen, ausnahmslos Männchen mit derselben Vorgeschichte.

Jeder Wurf blieb bis zum Alter von 50 Tagen bei den Elterntieren in großen Macrolon-Käfigen (55x33x15). Ab diesem Alter ist bei *Meriones* mit der Geschlechtsreife zu rechnen (Salzmann, 1963). Um unkontrollierte Verpaarung ebenso wie unnötige soziale Deprivation zu vermeiden, wurden deshalb die männlichen Jungtiere zwar aus dem Familienverband genommen, blieben aber weiterhin als Geschwistergruppe zusammen. Erst ab einem Alter von 120 Tagen, wenn in solchen Verbänden Rangordnungskämpfe einsetzen, lebten sie einzeln für weitere 30 ± 3 Tage in kleineren Macrolonkäfigen (35x20x15). So konnte sowohl Stress durch vorzeitige Isolation als auch durch Hierarchiekämpfe vermieden werden.

Als Kontrolle dieser stressarmen Aufzucht wurden die Gewichte von Thymus und Nebennieren herangezogen. Die Gewichte der paarigen Thymi der Versuchstiere ($63,23 \pm 18,03$ mg; $n = 110$ - nur intakte Exstirpate wurden gewogen) lagen weit über den Vergleichswerten von Streßtieren (Heinzeller & Aschauer, 1987). Ein Anstieg der Nebennierengewichte, wie er nach sozialem oder anderem Streß zu beobachten ist trat nicht auf. Das durchschnittliche Gewicht der paarigen Organe betrug $43,65 \pm 6,51$ mg ($n = 115$), bei gestreßten Tieren ist das Gewicht nahezu verdoppelt (Heinzeller, 1985).

Haltungsbedingungen: Die Tiere befanden sich in einem fensterlosen Raum (Temperatur zwischen 20 und 23°C) mit Tageslichtleuchten an der Decke und die Käfige in jeweils gleichem Abstand darunter, sodaß in allen 40 Lux herrschten; die Hellphase war von 5.00 - 19.00 Uhr, das entspricht einem 14:10 Std. Langtag. Während der Dunkelphase brannte ein diffuses Rotlicht von weniger als 1 Lux Beleuchtungsstärke. Die Tiere erhielten Altrumin-Trockenpellets und Wasser ad libitum, gelegentlich auch etwas frischen Salat. Die genannten Bedingungen wurden ganzjährig konstant gehalten, dennoch ist ein Einfluß der Jahreszeit auf die Tiere unverkennbar; im Herbst/Winter sind sie weniger fortpflanzungsfreudig als im Frühjahr/Sommer; entsprechend wurden bei Männchen im Januar deutlich leichtere akzessorische Geschlechtsdrüsen

(Prostata plus Samenblase) gefunden als im April/Mai
(358 $\pm$ 1755mg gegen 593 $\pm$ 52 mg; n jeweils = 7; p = 0.05).

2.2 Tagesgang und operative Eingriffe

In Gewichten stressrelevanter Organe waren auch nach den verschiedenen operativen Eingriffen keine Veränderungen zu beobachten.

2.2.1 Diurnale Veränderungen

Um 0.00, 4.00, 8.00, 12.00, 16.00 und 20.00 Uhr wurden jeweils 8 Tiere perfundiert (vgl. 2.3). Die Fixierungstermine der einzelnen Tiere schwanken höchstens eine halbe Stunde um die angegebene Zeit. Perfusionen in der Skotophase erfolgten bei schwachem Rotlicht, der Operationsraum war zuvor vollkommen gegen Licht von außen abgeschirmt worden.

2.2.2 Bilaterale Exstirpation des Ganglion cervicale superius.

Im Alter von 120 Tagen wurden 9 Rennmäuse mit 3,5% Chloralhydratlösung (in 0,09% NaCl, 1ml/100g KG) narkotisiert und im Kehlbereich von ventral eröffnet. Unter einer Stereo-Operationslupe wurde beiderseits das Ganglion cervicale superius exstirpiert. Die Schnittwunde wurde mit Wundklammern versorgt. Die Ganglien wurden in der in 2.3 für die Pinealorgane beschriebenen Weise fixiert und eingebettet. Der Erfolg des Eingriffes war nach dem Aufwachen der Tiere an der Ptosis (Erschlaffung der Lidmuskeln) abzulesen und wurde zusätzlich anhand von Semidünnschnitten der Exstirpate überprüft (Abb. 5).

Um zu kontrollieren, ob der Eingriff als solcher oder die Entfernung der Ganglien selbst für eventuelle Veränderungen im Pineale verantwortlich ist, wurden 6 Tiere scheinoperiert, d.h. narkotisiert und eröffnet, die Ganglien wurden freigelegt aber nicht entfernt. Die Perfusion beider Versuchsgruppen erfolgte nach weiteren 30 Tagen um 12.00 Uhr wie unter 2.3 beschrieben.

2.2.3 Kastration und Substitution mit Testosteronpropionat

Die Kastration von 25 Tieren erfolgte im Alter von 92 - 95 Tagen unter Chloralhydrat-Narkose durch Resektion von Hoden und Nebenhoden nach Abbindung der Samenstränge.

Als die Tiere vereinzelt wurden, also im Alter von 120 Tagen,

begann für 17 von ihnen eine Substitutionsbehandlung mit Testosteronpropionat (Nyby and Thiessen, 1971): ein Ansatz mit kontrollierter, peroraler Verabreichung von jeweils insgesamt 1 mg Testosteronpropionat (Sigma, St.Louis) an 8 Tiere wurde mangels erkennbarer Wirkung des Substitutes abgebrochen; in einem zweiten Ansatz erhielten 9 der kastrierten Tiere 2x wöchentlich eine Injektion von 0,1 ml einer 0,15%-igen Emulsion von Testosteronpropionat in sterilisiertem Sesamöl unter die Nackenhaut, insgesamt wurden pro Tier 1,5 mg Testosteron verabreicht.

Um eine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch circadiane Sensitivitätsrhythmen zu vermeiden, erfolgten die Injektionen immer zur gleichen Zeit (11.30 Uhr).

Einer Kontrollgruppe von 8 kastrierten Tieren wurden entsprechende Injektionen des Trägeröles appliziert.

Die Kontrolle des Substitutionseffektes (Abb. 6) stützte sich auf die Flächenausdehnung der sexualsteroidabhängigen, ventromedianen Markierdrüse (Del Thiessen and Yahr, 1977), sowie auf das Gewicht der androgenabhängigen, akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Samenblasen-Prostata-Komplex; Buzzell et al., 1984).

Die Perfusion aller Tiere erfolgte jeweils um 12.00 Uhr (vgl. 2.3).

2.3 Fixierung und Aufbereitung der Proben für TEM-Arbeiten

Die Narkose erfolgte durch Überdosierung (0,2 ml, i.p.) eines Barbiturates (Nembutal, Ceva, F-Neuilly-sur-Seine); die betäubten Tiere wurden gewogen, und ihre ventromedianen Markierdrüsen vermessen. Nach Thorakotomie wurde das Herz freigelegt; direkt in die linke Kammer wurden 0,2 ml Heparin-Natrium (B. Braun, Melsungen) injiziert, dann wurde eine Knopfkanüle plziert, durch die unter Druck (ca. 100 mBar) zunächst für etwa eine Minute physiologische Kochsalzlösung, dann das Fixans (Karnovsky, 1965: 4% Paraformaldehyd, 5% Glutaraldehyd in 0,1 M Sörensen-Phosphat-Puffer, pH 7,4) in das Gefäßsystem des Tieres geleitet wurden. Zum freien Abfluß von Blut und Perfusionsflüssigkeit wurde der rechte Vorhof eröffnet.

Das Pinealorgan, Thymus, Nebennieren und Hoden, bei einigen Tieren auch die akzessorischen Geschlechtsdrüsen wurden möglichst rasch entnommen und eine Stunde in frischem Fixans weiterfixiert. Außer dem Pineale wurden alle Organe gewogen.

Nach einstündigem Waschen mit Waschpuffer (Sörensen-Phosphat-Puffer mit 2,2 M Saccharose, pH 7,4) wurden die Proben für 2 Stunden in 1% OsO₄ in Phosphatpuffer nachfixiert, nach erneutem Waschen (1/2 Stunde) mit Waschpuffer in einer aufsteigenden Ätha-

Abb. 5.

Kontrolle der Ganglionektomie (vgl. 2.2.2).

Semidünnschnitt eines Exstirpates, das sich durch große Perikaryen von vegetativen Neuronen 2. Ordnung und durch Bündel dünner Axone deutlich als Grenzstrangganglion (Ganglion cervicale superius) erweist.

Schnittdicke 1 μm , Toluidinblau-Färbung.

Der Balken entspricht 100 μm .

Abb. 6.

Folgen von Kastration und Substitution (vgl. 2.2.3).

Wirksame Substitution mit Testosteronpropionat von Kastraten führt zu deutlich größerer Ausdehnung des ventralen Hautdrüsenfeldes und zu einer Gewichtszunahme der akzessorischen Geschlechtsdrüsen:

Aufnahmen der ventromedianen Markierdrüsen von

- links: einem Kontrolltier,
- Mitte: einem kastrierten Tier ohne Testosteron-Substitution,
- rechts: einem kastrierten Tier mit Testosteron-Substitution.

Beim mittleren Tier ist die Drüsentätigkeit völlig erloschen, mit bloßem Auge ist kein Drüsenfeld mehr zu erkennen, das entsprechende, schwach behaarte Hautareal, hell wie die Haut der Umgebung, ist nur aufzufinden, wenn das Haar der angrenzenden Gebiete angefeuchtet und zur Seite gestrichen wird. Beim unbehandelten und beim substituierten Tier ist das Drüsenfeld an dem gelbbraunen Sekret (dunkle Färbung der Drüse auf den Bildern) leicht erkennbar.

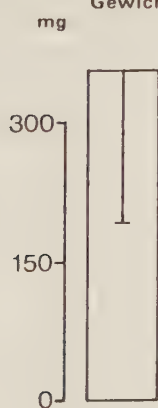
Histogramme des Geschlechtsdrüsengewichtes (links) und Hautdrüsenfläche (rechts):

- bei unbehandelten Kontrolltieren (weiße Säulen),
- bei kastrierten Tieren (dicht gepunktete Säule in der linken Graphik, Basislinie in der rechten),
- bei kastrierten, Testosteron-substituierten Tieren (locker gepunktete Säulen).

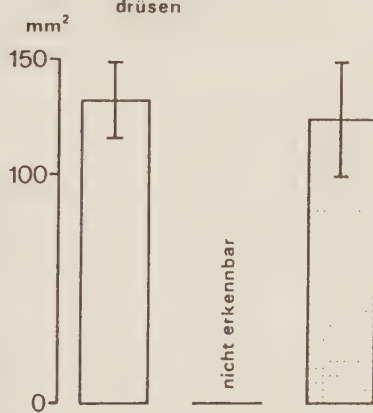
Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 Tieren.



Geschlechtsdrüsen-
Gewicht



Fläche der Markier-
drüsen



nolreihe entwässert und routinemäßig in Araldit (Serva, Heidelberg) eingebettet.

Die Perfusionsflüssigkeiten hatten Raumtemperatur, alle Fixierungsschritte bis einschließlich der Entwässerung in 70% Äthanol wurden bei Kühlschranktemperatur (ca. 4°C) durchgeführt.

Die eingebetteten Pinealorgane wurden an ihrem breitesten Teil senkrecht zur Längsachse geschnitten; nach Kontrolle der Anschnittebene an Hand von Toluidinblau-gefärbten Semidünnschnitten (1 μm) wurden an einem Ultratom III (LKB) mit Glasmessern Ultradünnschnitte (silber bis silbergold) angefertigt und auf mit Pioloform (Wacker, Burghausen) befilmten Lochgrids aufgefangen. Die Schnitte wurden in einem Ultrastainer (LKB) mit wässrigen Lösungen von Uranylacetat (0,5%; 60 min, 40°C) und Bleicitrat (3%; 20 min, 20°C) kontrastiert und an einem EM 10 (Zeiss) untersucht.

2.4 Morphometrische Auswertung

Die morphometrische Auswertung der Pineal-Querschnitte erfolgte in zwei Schritten: 1. eine direkt am TEM vorgenommene Zählung von Kontakten des eR mit dem Plasmalemm und 2. eine messende Auswertung von 10 Micrographien pro Tier.

1. Schritt. Die Zählung direkt am TEM bei hoher Vergrößerung (40 000 x) wurde ausgeführt, um einen großen Flächenanteil des Organquerschnittes zu erfassen. Diese Zählung enthält sämtliche Annäherungen des eR an das Plasmalemm, also nicht nur solche, die als wirkliche ssc anzusprechen sind (vgl. 3.1). Zwei senkrecht zueinander stehende Bahnen von Organrand zu Organrand wurden ausgewertet (ungefähr der Längs- und Querachse des ellipsoiden Schnittes entsprechend). Die Bahnbreite = Leuchtschirmbreite beträgt bei dieser Vergrößerung 3,68 μm , die Bahnlänge wurde aus der Objektverschiebung (1.84 $\mu\text{m}/\text{Einheit}$) errechnet; pro Schnitt ergab sich somit die Inspektion einer Fläche von durchschnittlich etwa 3 000 μm^2 .

2. Schritt. Diese Auswertung basiert auf Micrographien. Um die zufällige Auswahl der fotografierten Stellen sicherzustellen, wurde von jedem Schnitt zuerst mit Hilfe der x,y-Koordinaten der Objektverschiebung eine Umrißzeichnung erstellt. In dieser Skizze wurden die Koordinaten der Stellen zufällig festgelegt, die anschließend fotografiert wurden (Primärvergrößerung 10 000x). Alle Aufnahmen wurden mit derselben photographischen Nachvergrößerung abgezogen (2.3 fach). Schräganschnitte von Membranen auf den Micrographien wurden nicht ausgewertet. Zur Längenmessung von ssc und Anschnitten der Zellmembran diente ein halbautoma-

tisches Bildanalysegerät (MOP-Videoplan, Kontron, Eching). Nur Anschnitte des eR, die sich auf etwa 15 nm an die Pinealozytenmembran annähern und länger als 150 nm sind, wurden als ssc gewertet.

Für jedes Tier wurden aus der Summe der Einzelbilder neben der Gesamtlänge der angeschnittenen Pinealozytenmembran als Bezugsgröße die Gesamtzahl der ssc und deren Gesamtlänge ermittelt, aufgeschlüsselt nach der Art der Nachbarzelle (Pinealozyt, Gliozyt oder Nervenfaser) und danach, ob es sich um eine ssc ohne oder mit einem Pendant in der Nachbarzelle handelt (sog. einseitige bzw. zweiseitige ssc). Bei letzteren wurde jeweils auch die Länge der Überlappung ausgemessen.

2.5 Statistik

Gruppendifferenzen wurden soweit zulässig mit dem U-Test überprüft. Die Werte der ssc-Längen wurden dem Test nach Kolmogoroff und Smirnow auf Verteilungsunterschiede unterworfen. Solche Tests waren an Sachs, 1978, orientiert, ebenso die Varianzanalyse nach R.A. Fisher, mit deren Hilfe die Existenz von Gruppendifferenzen festgestellt wurde, soweit sie auf eine diurnale Rhythmik untersucht werden sollten.

Zur Prüfung der Daten auf das Vorhandensein von Periodizitäten und deren Eigenschaften wurde durch Aneinanderreihung der Einzelergebnisse zu den verschiedenen Zeitpunkten künstlich eine über 192 Stunden kontinuierliche Meßreihe erzeugt, die mit Hilfe eines Computerprogrammes (Weiss et al., 1987) der Fourieranalyse unterzogen wurde. Aus den Resultaten der Fourieranalyse wurde das Powerspektrum errechnet und mit dem zugehörigen Graphikhilfsprogramm dargestellt. Als Kontrolle diente eine neuerliche zufällige Zusammenstellung der Einzelwerte.

2.6 Computergestützte 3D-Rekonstruktion der ssc

Für die Herstellung von Schnittserien wurde ein Blöckchen mit optimaler Gewebserhaltung und guter Schneidbarkeit (keine großen Kalzifikationen) ausgewählt, insbesondere mußte es ideal quer getroffene Anschnitte von Zellmembranen der Pinealozyten enthalten.

Eine ausgesuchte Anschnittfläche wurde quadratisch (Seitenlänge etwa 100 µm) getrimmt, eine Wand des Blöckchens am Ultramikrotom senkrecht zur Schnittebene abgestochen. Dadurch erhielten die Serienschnitte eine sehr scharfe Kontur, die bei Folgeschnitten zuverlässig übereinanderliegt und sich bei der Zuordnung von

Abb. 7.

Lage des rekonstruierten Pinealozytensektors im Organ (vgl. 2.6). Die senkrecht getrimmte Orientierungskante verläuft rechts im Bild. Der Bereich des Pinealozyten P_1 , der zur Rekonstruktion ausgewählt wurde, ist kariert. Der ssc-Besatz der benachbarten Pinealozyten P_2 und P_3 wurde an der Grenze zum rekonstruierten Sektor von P_1 mitaufgezeichnet.

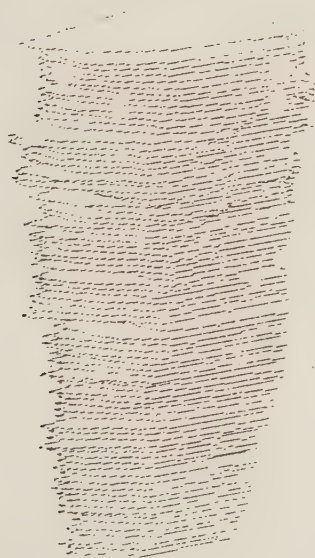
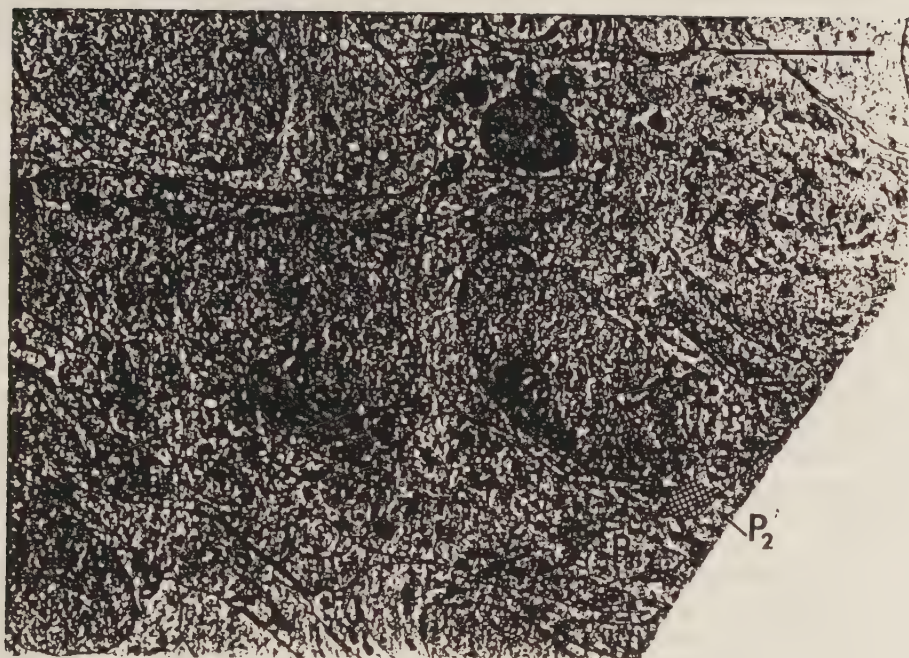
G = Gliozyt.

Der Balken entspricht 5 μm .

Abb. 8.

Rekonstruktionstechnik (vgl. 2.6).

Entstehung der räumlichen Aufsicht auf den Pinealozyten P_1 . Links Stapel der orientierten Rohscheiben, der aus der Aufzeichnung der Konturen von 84 Konsekutivschnitten entstanden ist, rechts die zeichnerische Glättung der Oberfläche und Wiedergabe der Orientierungsebene (= Ebene der aufgezeichneten Orientierungskanten aller Einzelschnitte) als fein punktiertes Rechteck.



Folgebildern (s.u.) als sehr hilfreich erwies.

Von diesem Block wurde eine komplette Serie von 125 konsekutiven Schnitten angefertigt. Die Interferenzfarbe der Schnitte war silber-golden, sodaß von einer Schnittdicke von 90 nm ausgegangen werden kann (Peachey, 1958).

An einem weiteren Blöckchen war versucht worden, als Orientierungshilfe "Bohrlöcher" in den Block zu setzen: mit einem UV-Laserstrahl (Lambda Physik Excimerlaser, EMG 201 MSC) wurden bei einer Wellenlänge von 193 nm mehrere kegelförmige Bohrungen im Abstand von 50 μm eingebracht, Lochdurchmesser an der Probenoberfläche 20 μm , Tiefe 100 μm . Dieser Versuch Markierungen zu setzen, scheiterte daran, daß die Schnitte beim Strecken an den Bohrstellen auseinanderrißen.

Bei der Anfertigung elektronenmikroskopischer Bilder (primär 31 800 x) wurde darauf geachtet, daß stets auch die obengenannte Schnittkontur aufgenommen wurde. Papierbilder der Endvergrößerung 73 000 x konnten an Hand dieser Kontur und von zwei für jedes Paar von Folge-Bildern neu auszuwählender markanter Punkte exakt übereinander orientiert werden. Die interessierenden Strukturen wurden dem Bildanalysegerät über ein graphisches Tablett eingegeben und mit dem zugehörigen 3-D Rekonstruktionsprogramm verarbeitet. Dieses Programm errechnet für beliebige Blickwinkel und Perspektiven die exakte Größe und Position der Bildstrukturen und löscht verdeckte Linien; die Glättung der Oberflächen von einer Darstellung aus Höhenlinien zu einem plastischen Abbild wurde mit zeichnerischen Mitteln erreicht.

Aus einer Folge von 84 Bildern wurde der ssc-Besatz von circa 30 μm^2 Zellmembran rekonstruiert; an einer Sicht en face dieser Membran wurde eine Flächenmessung der einzelnen Kontakte von eR und Zellmembran ebenso möglich wie eine Bestimmung des Überlappungsgrades von ssc aus Nachbarzellen. Eine mögliche räumliche Beziehung von Zellkontakten und ssc wurde in dieser Rekonstruktion ebenfalls überprüft. Aus 21 Bildern von einer anderen Schnittstelle wurde die Beziehung einer großen ssc zu eR und Golgi-Apparat rekonstruiert (Abb. 7 und 8).

2.7 Gefrierbruch

Am Vorabend (18 - 20 h) wurden die Tiere wie unter 2.3 perfusionsfixiert (Fixans nach Karnovsky 1:1 verdünnt, Cacodylat anstatt Phosphatpuffer), die Pinealorgane entnommen, im selben Fixans nachfixiert (1 h bei Raumtemperatur) und nach Waschen in Cacodylatpuffer (0,1 M; pH 7,4) über Nacht in 30% Glycerin in 0,1 M Cacodylatpuffer belassen. Am folgenden Morgen wurden die

Organe in flüssigem Propan aufgefroren und in einer Gefrierätzanlage (Balzers, BA 360M) schrittweise etwa bis zur Organmitte gebrochen. Diese Bruchstelle wurde bei -100°C 15 Minuten geätzt, anschließend mit Platin (Schichtdicke 25 – 30 nm, gemessen mit einem Schwingquarkristall) und Kohle (Schichtdicke etwa 100 nm) beschattet. Die Replicaen wurden in destilliertem Wasser (mit etwas Aceton) abflottiert, in 5% Na-Hypochlorit übertragen und darin zwei Stunden gesäubert, nach 12 h Wässerung auf Pioloform-befilmte Lochgrids übertragen und im EM 10 (Zeiss) untersucht.

2.8 Histochemischer Nachweis von Kalzium

2.8.1 Komplexbildung mit Osmium-Blutlaugensalz

Die Grundlage dieses Verfahrens (Walz, 1982) ist, daß unter Kalzium-Protektion fixiert wird, d.h. die eingesetzten Lösungen enthalten sämtlich soviel Kalzium, daß ein passiver Diffusionsverlust von zelleigenem Kalzium verhindert wird. Dabei wird das Interstitium stark mit Kalzium angereichert.

Narkose und transkardiale Perfusion (10 min) der Tiere wie unter 2.3; Perfusionslösung: 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,4) unter Zusatz von 5 mM CaCl_2 . Pinealorgane und Skelettmuskelproben (Musculus psoas) wurden entnommen und in frischer Lösung derselben Zusammensetzung bei Raumtemperatur 1 h nachfixiert. Nach einstündigem Waschen in kaltem (4°C) Cacodylat-Puffer (pH 7,4) Überführung der Proben in Osmium-Blutlaugensalz (1% OsO_4 , 0,8% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,4) bei 4°C für 2 h; nach erneutem Waschen in Cacodylat-Puffer erfolgte die Einbettung für die Elektronenmikroskopie, vgl. 2.3. Zur Identifizierung der Kalzium-Niederschläge unterblieb eine weitere Kontrastierung der Ultradünnschnitte.

Kontrolle: Da Kalzium in großen Mengen von außen zugesetzt worden war, wurde auf eine strenge Prüfung des tatsächlichen Kalziumgehaltes der Niederschläge verzichtet, zumal sich solche nur im Interstitium fanden und die Empfindlichkeit der Methode nicht zur Darstellung von intrazellulärem Ca^{2+} ausreichte. Die entsprechende Beobachtung wurde auch als Kontrolle dienenden Skelettmuskel gemacht (Abb. 9).

2.8.2 Nachweis der ATP-abhängigen Ca^{2+} -Akkumulation der ssc

Um zu prüfen, ob ssc überhaupt in die Regelung der intrazellulären Kalzium-Verteilung eingreifen können, mußte gezeigt werden, daß ihre Membranen zu einer aktiven Ca^{2+} -Sequestrierung geeignet

Abb. 9.

Fällung mit Osmium-Blutlaugensalz (vgl. 2.8.1): Längsschnitt einer Skelettmuskelprobe.

In den extrazellulären Räumen des T-Systems führt die hohe Ca^{2+} -Konzentration der Perfusionslösung zu massiven Reaktionen; die Räume des L-Systems (eR-Netz), bekanntermaßen reich an zelleigenen Kalziumionen, zeigen keine verwertbare Kontrastverstärkung.

M = Mitochondrium, T = T-System, L = L-System.

Der Balken entspricht 1 μm .

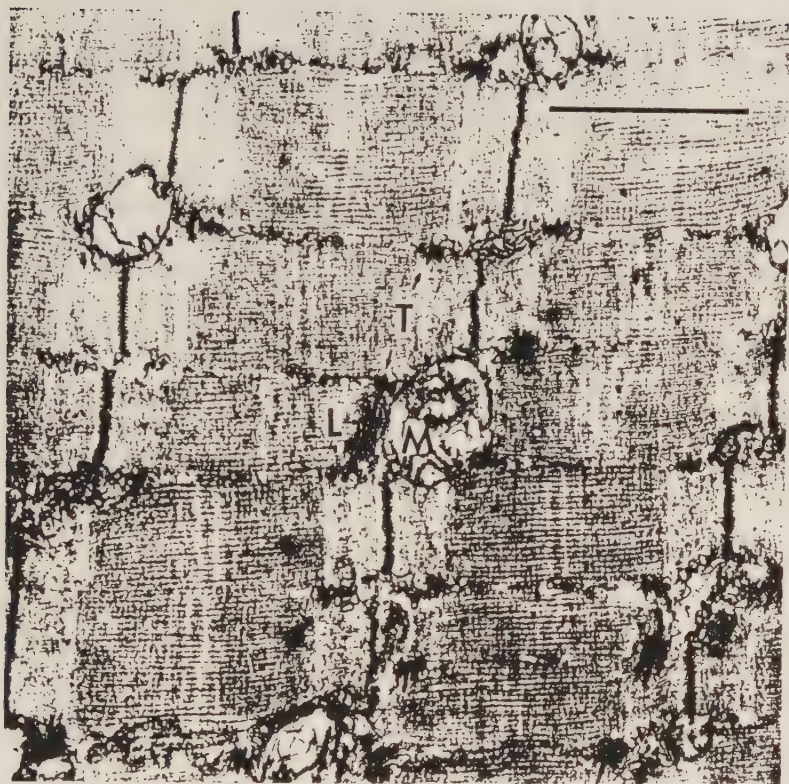
Abb. 10.

Oxalat-Fällung (vgl. 2.8.2): Längsschnitt einer Skelettmuskelprobe.

Skelettmuskeltgewebe mit sehr grobschollig ausgefällten, aber doch eindeutig dem L-System zuzuordnenden Niederschlägen von Kalziumoxalat. Die Aufblähung sämtlicher Zisternen ist ein unvermeidlicher Effekt der Permeabilisierung des Plasmalemmes mit Saponin.

Der Schnitt ist unkontrastiert.

Der Balken entspricht 1 μm .



sind. Hierzu befähigte Organellen akkumulieren in mit Saponin permeabilisierten Zellen unter ATP-Verbrauch Kalziumionen aus einem angebotenen Medium mit eingestelltem Ca^{2+} -Gehalt; die aufgenommenen Kalziumionen können anschließend mit Kaliumoxalat ausgefällt werden (Walz, 1982; Wakasugi et al., 1982; Walz, pers. Mitteilung).

Nach Narkose mit Nembutal, vgl. 2.3, erfolgte rasche Gewebeentnahme und Übertragung in ein Permeabilisierungsmedium (jeweils in mM: 100 KCl, 10 MgCl_2 , 5 Na_2ATP , 2 K_2EGTA , 20 Histidin, 40 Saccharose, pH 7,4 mit KOH eingestellt; kurz vor der Verwendung wurden 500 $\mu\text{g/ml}$ Saponin durch Ultraschall in dem Medium gelöst) für 10 - 15 min bei Raumtemperatur, anschließend Inkubation im Lademedium (jeweils in mM: 75 KCl, 25 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$, 10 MgCl_2 , 5 Na_2ATP , 20 Histidin, 40 Saccharose, 1 K_2EGTA , 4 CaEGTA , pH 7,0 mit KOH) für 1 h, ebenfalls bei Raumtemperatur. Die Regulation der freien Kalzium-Ionen in diesem Medium erfolgt durch das Verhältnis von Ca-EGTA zu $\text{K}_2\text{-EGTA}$. Die Lösungen wurden jeweils aus Stammlösungen hergestellt, die EGTA -Lösungen unter Erhitzen aus 0,1 M H_4EGTA (Fluka) und 0,1 M KCl bzw. CaCO_3 und filtriert. Die Fixierung der so vorbehandelten Proben erfolgte in 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer nach Sørensen (pH 7,4) für 1 h bei Raumtemperatur; danach Waschen (30 min) in Phosphatpuffer und Nachfixierung in 2% OsO_4 in Phosphatpuffer (1 h bei 4°C) nach erneutem Waschen (30 min) Einbettung wie unter 2.3. Die Schnitte wurden sowohl unkontrastiert, als auch kontrastiert mikroskopiert.

Kontrolle: Als bekanntermaßen Ca^{2+} -sequestrierendes Vergleichsorganell diene das longitudinale eR-Netz (L-System) im Skelettmuskel (Abb. 10).

2.8.3 Lokalisation von intrazellulärem Kalzium mit Pyroantimonat

Eine höchst empfindliche Methode ist die Ausfällung mit Kalium-Pyroantimonat (PPA), die sich auf Grund sehr feiner Niederschläge und guter Gewebserhaltung für die intrazelluläre Lokalisation von Kalzium eignet (Modifikationen der Methode, beschrieben bei Duce and Keen, 1978; Seydewitz, pers. Mitteilung).

Nach Barbiturat-Narkose (vgl. 2.3) wurden die Tiere mit 2,5% Glutaraldehyd in 0,075 M K-Acetatpuffer (pH 7,4, mit KOH oder Essigsäure) perfundiert (7 min), die Organe entnommen, wobei das Pinealorgan mehrfach eingeritzt wurde, und 2 h in PPA-Glutaraldehyd bei Raumtemperatur immerniert; zur Herstellung dieser Lösung (2% PPA, 2,5% Glutaraldehyd in Wasser) muß PPA 1/2 h in A. dest. (Serva, Heidelberg) gekocht und der Glutaraldehyd tropfen

weise eingerührt werden, während der pH mit KOH ständig über 8 gehalten wird; die Lösung muß zentrifugiert (5 min, 5 000 Umdrehungen) und dann sofort verwendet werden. Nach der Fixierung wurde 3 x 10 min gewaschen und mit 1% OsO₄ in 0,075 M K-Acetatpuffer (pH 7,4) 2 h bei Raumtemperatur nachfixiert, 2 x kurz in K-Acetatpuffer gewaschen, entwässert und eingebettet.

Es wurden goldene Schnitte (etwa 120 nm; Peachey, 1958) unkontrastiert bei hoher Vergrößerung (der Niederschlag ist etwa ab 20 000-facher Vergrößerung erkennbar) untersucht.

Kontrollen: Der Kalzium-Gehalt dieser Niederschläge wurde durch röntgenologische Elementanalyse (EDAX, Abb. 11) geprüft, und zusätzlich durch einen Lösungsversuch mit Äthylenglykoltetraessigsäure (EGTA): Schnitte wurden auf Maschengrids aufgezogen und an repräsentativen Stellen photographiert (Abb. 12 a); daraufhin wurden die Grids 40 min in 60°C warmer 10 mM EGTA-Lösung (in destilliertem Wasser, pH 9-10 zum Lösen des EGTA, anschließend mit HCl neutralisiert, pH 7,2) inkubiert; im TEM wurden die gleichen Stellen aufgesucht und erneut photographiert (Abb. 12 b).

Als weitere Kontrollen wurde die Reaktion von Gewebestellen bzw. Organellen mit bekannt hohem Ca²⁺-Gehalt beobachtet, vgl. Abb. 13 - 15.

2.8.4 Diurnale Veränderung in der intrazellulären Ca²⁺-Verteilung

Zum Vergleich mit den während des Tages erhobenen Befunden zur intrazellulären Ca²⁺-Verteilung wurden 6 Tiere während der Dunkelphase zwischen 23.30 und 1.00 Uhr fixiert und wie bei 2.8.3 untersucht. Vier weitere Tiere wurden in der Mitte ihrer Dunkelphase Weißlicht von 2 000 Lux Beleuchtungsstärke ausgesetzt (zwei Tiere für 1 h, zwei Tiere für 2 h) und anschließend wie beschrieben fixiert.

2.8.5 Einfluß von Dantrolen-Natrium

Vier Tieren wurde um 18.00 Uhr (also noch in der Photophase) jeweils 1 mg Dantrolen (Röhm, Weiterstadt) i.p. injiziert. Die Substanz war in Propandiol unter leichtem Erwärmen gelöst worden. In der Mitte der Skotophase wurden die Tiere mit CO₂ narkotisiert (Barbiturat ist nach dieser Vorbehandlung wirkungslos) und wie unter 2.8.3 präpariert.

Abb. 11.

Röntgen-Mikro-Elementanalyse (EDAX, vgl. 2.8.3).

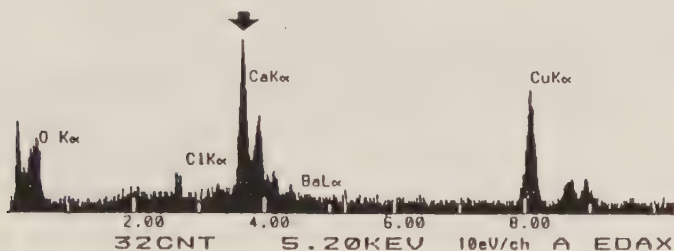
Analysen an silber-goldenen unkontrastierten Ultradünnschnitten (Nederlandse Philips Bedrijven B.V., Eindhoven); Aufzeichnung der Energiespektren von Meßfeldern mit 100 nm Durchmesser.

A: Messung einer Schnittstelle mit dichtem Reaktionsprodukt: im Energiebereich des Elementes Kalzium ist ein deutlicher Gipfel zu sehen (schwarzer Pfeil).

B: In einem niederschlagsfreien Bereich des Präparates fehlt dieser Gipfel (weisser Pfeil).

A

14-AUG-87 10:30:44 EDAX READY
 RATE- 389CPS TIME- 179LSEC
 FS- 1016CNT PRST- OFF



B

14-AUG-87 10:32:45 EDAX READY
 RATE- 390CPS TIME- 179LSEC
 FS- 474CNT PRST- OFF

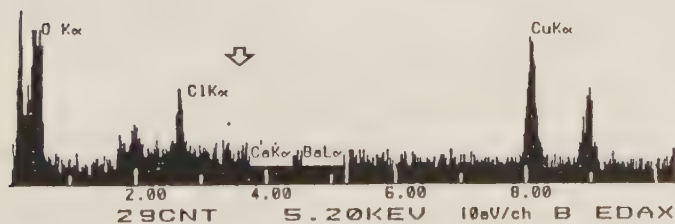


Abb. 12.

Ca^{2+} -Komplexierung mit EGTA (vgl. 2.8.3).

Der Kalziumgehalt der untersuchten Niederschläge zeigt sich auch durch ihre Lösbarkeit im Kalziumchelator EGTA.

a) Repräsentative Stelle vor und

b) dieselbe Stelle nach EGTA-Behandlung.

Niederschlagskörner, deren Durchmesser im Bereich der Schnittdicke liegt, sind dem Lösungsmittel zugänglich und wurden herausgelöst (Pfeile), feinkörniger Niederschlag ist rundum von Araldit eingeschlossen und deshalb zum überwiegenden Teil erhalten.

Unkontrastierter Schnitt.

Der Balken entspricht 1 μm .

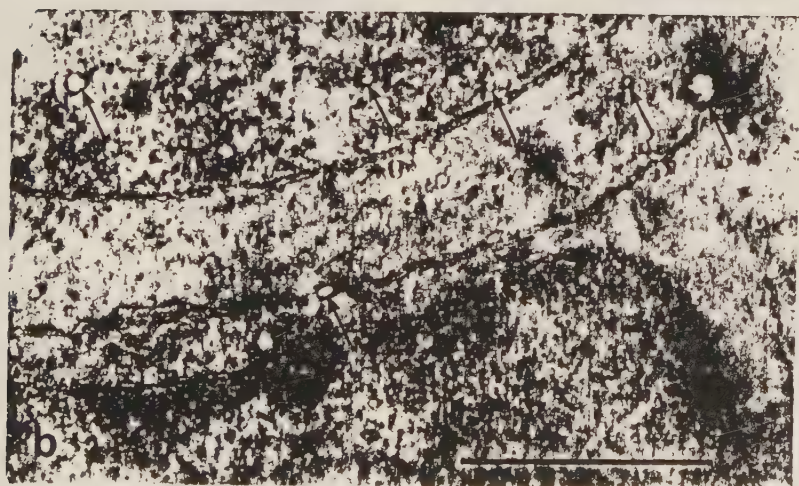
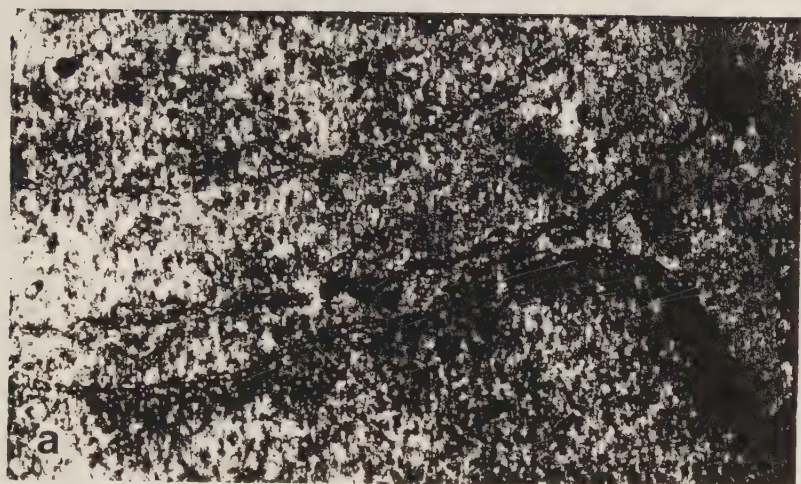


Abb. 13.

Herzmuskel.

Ultradünnschnitt (längs) von Herzmuskelgewebe nach Präparation mit der PPA-Methode. Das L-System wird durch körnige Niederschläge hervorgehoben.

M = Mitochondrium.

Schnittdicke etwa 200 nm.

Unkontrastierter Schnitt.

Der Balken entspricht 1 μm .

Abb. 14.

Myelinisierte Nervenfaser.

Schrägschnitt durch ein Axon im PPA-fixierten Pinealorgan. Feiner elektronendichter Niederschlag findet sich im Lumen des Ca^{2+} -sequestrierenden axoplasmatischen Retikulums (Pfeile); größere elektronendichte Körner liegen dem Axolemm und der Myelinscheide außen an.

Unkontrastierter Schnitt.

Der Balken entspricht 0,5 μm .

Abb. 15.

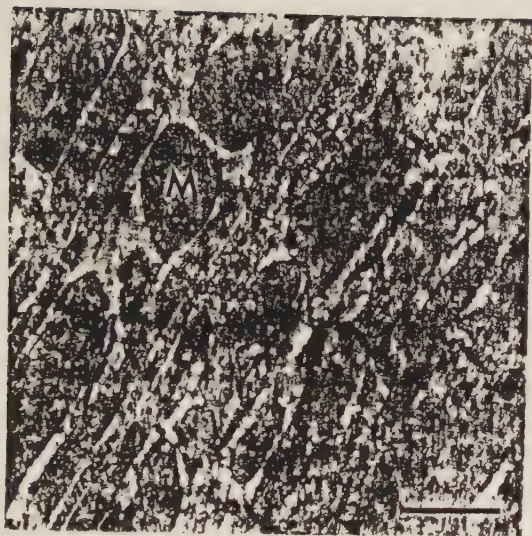
Intrazellulärer Acervulus.

Die konzentrisch angeordneten Kristallnadeln von Hydroxyapatit, die während des Mineralisationsvorganges in Vakuolen entstehen, sind nach der Präparation mit der PPA-Methode elektronendicht dargestellt; der Pfeil markiert die Vakuolenmembran.

K = Kern mit vereinzelt Niederschlägen.

Unkontrastierter Schnitt.

Der Balken entspricht 0,5 μm .



3. Ergebnisse

3.1 Morphologie der "subsurface cisterns"

3.1.1 Ultradünnschnitte

Aussehen. Die in Pinealozyten von *Meriones unguiculatus* beobachteten ssc sind - ungeachtet erheblicher Größenunterschiede, s.u.- im flächigen Anschnitt von sehr konstantem Bau und entsprechen der Definition dieser Suborganellen (vgl. 1.2): Querdurchmesser 20 nm, wobei dieser Abstand der Zisternenmembranen, ebenso wie der zum Plasmalemm (15 nm) über die gesamte Länge der Zisterne kontinuierlich eingehalten wird. Einzelne Zisternenanschnitte liegen oft nahe zusammen und können sogar aneinanderstoßen (Abb. 20). Häufig ist eine Verbindung mit Bereichen des tieferen eR angeschnitten (Abb. 3). Diese Verbindung reicht bis zur Perinuklearzisterne, gelegentlich tritt sogar diese den Kern umgebende eR-Zisterne selbst bis an die Plasmamembran heran und wird dadurch in diesem Abschnitt zur ssc (Abb. 16).

33% der beobachteten Zisternen besitzen ein Pendant in der Nachbarzelle, vgl. Abb. 4 ("zweiseitige" ssc im Gegensatz zu "einseitigen" ssc, denen eine solche Entsprechung fehlt). Auffällig häufig haben lange ssc einen solchen "Partner" im Nachbarpinealozyten, so alle über 1.0 µm langen Zisternenanschnitte.

Vorkommen. Oberflächennah gelegene eR-Zisternen dieses Aussehens wurden niemals in Gliazellen oder Nervenfasern des Pinealorgans gefunden, sondern ausschließlich in den Pinealozyten selbst (Abb. 18). Im ausgewerteten Untersuchungsgut grenzen Pinealozyten zumeist wieder an Pinealozyten, nämlich auf 94,6% der vermessenen Grenzstrecke zwischen Pinealozyten und beliebigen Nachbarzellen. An solchen Grenzen zwischen Pinealozyten wurden auf einer Gesamtlänge von 21 359,8 µm insgesamt 3 435 ssc gefunden, die zusammen 1 266,0 µm messen. Daraus ergibt sich, daß 5,6% der Anschnittlänge von Plasmamembranen benachbarter Pinealozyten von ssc begleitet werden.

Abb. 16.

Ssc-Bildung durch die Kernmembran.

Die perinukleäre Zisterne (ebenfalls ein Suborganell des eR) lagert sich gelegentlich an das Plasmalemm an und verläuft ein Stück weit parallel dazu. Diese Erscheinung entspricht der Definition von ssc.

- a. Die perinukleären Zisternen zweier benachbarter Pinealozyten bilden zweiseitige ssc aus (Pfeilköpfe).
- b. Die perinukleäre Zisterne des einen Pinealozyten und eine ssc des benachbarten Pinealozyten bilden zweiseitige ssc aus (Pfeilköpfe).

K = Kern.

Der Balken entspricht 1 μm .

Abb. 17.

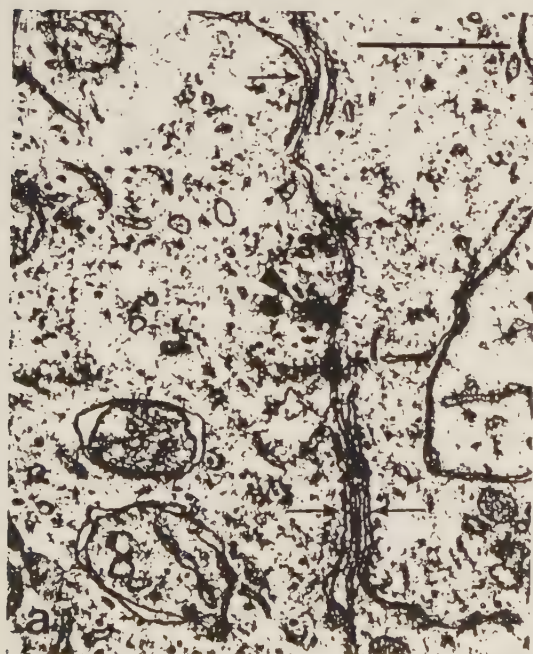
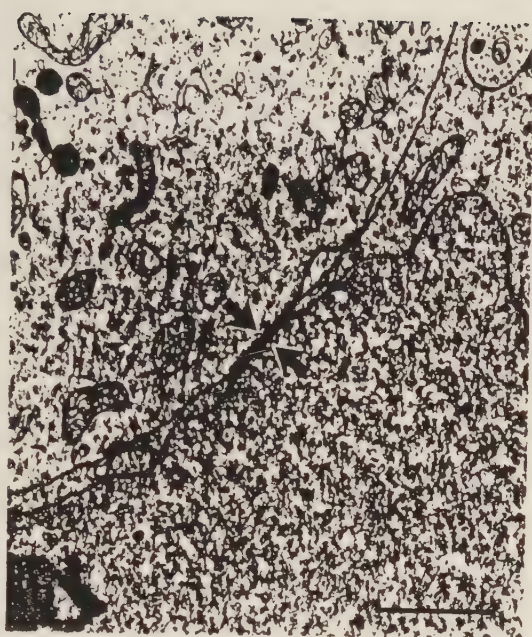
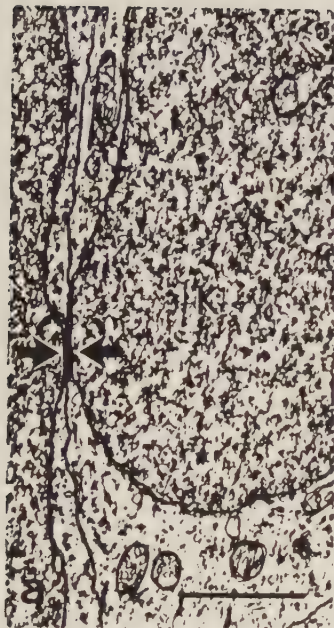
Zellkontakte und ssc.

Mechanische Verbindungen, sogenannte "adhering junctions" (*) zwischen benachbarten Pinealozyten in unmittelbarer Umgebung von zweiseitigen und großflächigen ssc (Pfeile).

- a. Der Zellkontakt liegt zwischen einer zweiseitigen ssc und einem "synaptic ribbon" (Pfeilkopf).
- b. Im Bereich des Zellkontaktes vermeiden die eR-Zisternen die unmittelbare Nähe des Plasmalemm.

Mt = Mikrotubulus

Der Balken entspricht 0.5 μm .



Im gleichen Untersuchungsgut liegen einer Gesamtlänge von 1 186,1 μm Plasmamembran von Pinealozyten jenseits des Interzellularspaltes Gliazellen oder unmyelinisierte Axone gegenüber (Abb. 18 und 19). An diesen Pinealozyten-Membranen wurden 208 ssc mit einer Gesamtlänge von 65,8 μm beobachtet; das bedeutet, daß 5,6% auch dieser Plasmamembranen mit ssc besetzt sind. Pinealozyten plazieren ihre ssc also unabhängig von der Art der Nachbarzelle. Dieser Befund deckt sich mit der gelegentlichen Beobachtung, daß ein und dieselbe eR-Zisterne an einer Stelle als ssc einem Pinealozyten gegenüberliegt und in geringem Abstand davon als ssc gegenüber einem anderen Zelltyp (Abb. 19).

Benachbarte Pinealozyten sind durch tupfenförmige "adhering junctions" (Nomenklatur nach Weiss, 1988) verbunden, die häufig mit ssc assoziiert sind, und zwar dergestalt, daß ssc - meist zweiseitig - die "junction" umgeben, den Zellkontakt selbst jedoch weitgehend unbedeckt lassen (Abb. 17).

Eine Korrelation von "gap junctions" (seltenere Zellkontakte zwischen Pinealozyten) und ssc ist nicht zu beobachten.

In der unmittelbaren Umgebung von ssc sind immer wieder Mikrotubuli zu beobachten (Abb. 17 und 19).

Länge. Die Anschnittlänge der ssc in den Pinealorganen der für diese Bestimmung herangezogenen 48 Tiere beträgt $0.33 \pm 0.16 \mu\text{m}$; selten sind Anschnitte über 1.0 μm (0.7% aller gefundenen ssc); der längste registrierte Zisternenanschnitt mißt 1,8 μm . Eine Aufspaltung der Längenwerte nach dem Gesichtspunkt der Ein- oder Zweiseitigkeit (Abb. 21) ergibt statistisch signifikant größere Werte bei den zweiseitigen ssc:

einseitige ssc: $0.29 \pm 0.11 \mu\text{m}$; n = 1780

zweiseitige ssc: $0.40 \pm 0.20 \mu\text{m}$; n = 1255

Die statistische Prüfung der Gruppendifferenz ergibt ein Signifikanzniveau von 0.001 (Test nach KOLMOGOROFF-SMIRNOFF).

Der Überlappingsgrad der zweiseitigen Zisternen ist sehr variabel, einer langen ssc in der einen Nachbarzelle können auch mehrere Zisternenanschnitte gegenüberliegen (Abb. 20).

Die Anschnitte von zweiseitigen Zisternen überlappen auf durchschnittlich 38% ihrer Länge.

3.1.2 Gefrierbruch

Membranen werden beim Gefrierbruch von Zellverbänden wie dem Pinealorgan sehr häufig quer, seltener leicht schräg und sehr selten flächig (tangential) getroffen. Dabei läßt der Querbruch Abbildungen entstehen, die denjenigen von Querschnitten weitestgehend entsprechen (Abb. 22 a). Bei Schräg- bzw. Tangentialbrüchen werden die Einheitsmembranen üblicherweise so gespalten, daß ihre hydrophobe Mittelschicht exponiert wird; zusätzlich kann die Ätzung die hydrophile Oberfläche freilegen, wenn die betreffende Membran beim Bruch intakt geblieben ist und nur knapp unter der Bruchebene verläuft (zur Nomenklatur siehe Branton et al., 1975). Vor allem solche flächigen Aufsichten erlauben eine über das Schnittbild der Routine-TEM hinausgehende Charakterisierung von Membranen, besonders wenn durch die Schrägbedampfung des Präparates makromolekulare Membranpartikel sichtbar werden.

Im vorliegenden Untersuchungsgut konnten weder in den Membranasichten der ssc (Abb. 22 b), noch des darüberliegenden Plasmalemms spezifisch angeordnete Membranproteine, Poren oder sonstige Substrukturen festgestellt werden. Die für "gap junctions" typischen Partikelanordnungen (Goodenough & Revel, 1970) wurden auch in den Replicaen von Plasmamembranen der Pinealozyten gefunden, jedoch ohne Assoziation mit ssc; "adhering junctions" (vgl. Abb. 17) konnten nicht beobachtet werden.

3.1.3 Computergestützte 3D-Rekonstruktion der ssc

Versteht man die Anschnittsbilder von ssc als ihre Abbildung "en profil", so erlaubt die Rekonstruktion aus Serienschnitten eine Darstellung "en face", also eine Ansicht, wie sie sich ergibt, wenn man aus dem Inneren einer Zelle auf ihre Membran blickt. Dabei liegen die ssc vom Betrachter aus gesehen natürlich vor der Zellmembran; denkt man sich ebendiese Membran durchsichtig und auch die der Nachbarzelle, so kommen die ssc der Nachbarzelle mit ins Bild, sie liegen dann hinter den zuerst abgebildeten ssc und hinter dem Interzellularspalt samt den beiden ihn begrenzenden

Abb. 18.

Ssc-bildung gegenüber einer Gliazelle.

Zwischen zwei Pinealozyten liegt eine Gliazelle, deutlich zu erkennen am randständigen Heterochromatin des Zellkernes. Das eR der Pinealozyten bildet an der Grenze zur Gliazelle typische ssc unter der Plasmamembran (Pfeile). Das eR der Gliazelle reicht zwar wiederholt nahe an das Plasmalemm (*), legt sich aber nicht als flache Zisterne parallel an.

G = Gliazelle, P = Pinealozyt, K = Kern.

Der Balken entspricht 1 μ m.

Abb. 19.

Ssc-bildung gegenüber einem Axon.

Ein Pinealozyt umschließt ein unmyelinisiertes Axon (Ax) und bildet hier eine ssc (kleiner Pfeil). Das eR-Kontinuum dieser ssc legt sich in der Nachbarschaft eines weiteren Pinealozyten erneut als ssc der Zellmembran an (großer Pfeil).

P = Pinealozyt, M = Mitochondrium, Mt = Mikrotubuli.

Der Balken entspricht 1 μ m.

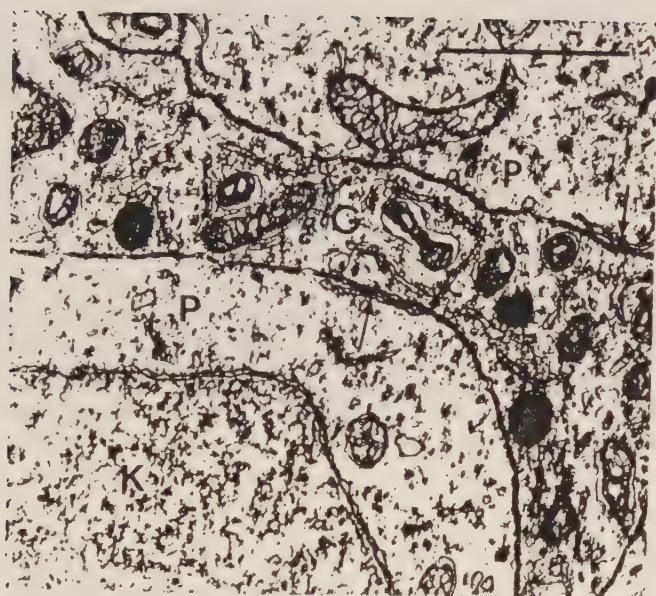


Abb. 20.

Ssc-Bildung gegenüber Pinealozyten.

Einseitige (Pfeilkopf) und zweiseitige Zisternen (Pfeile). Im Falle der zweiseitigen Zisterne liegen einer langen ssc der unteren Zelle in der oberen Zelle zwei getrennte ssc gegenüber. Ob die Unterbrechung (*) als Fenster einer großflächigen ssc anzusehen ist, kann anhand des Schnittbildes nicht entschieden werden.

K = Kern.

Der Balken entspricht 0.5 μ m.

Abb. 21.

Ssc-Länge.

Histogramme der Anschnittlängen aller ausgewerteten ssc, getrennt dargestellt für einseitige und zweiseitige Zisternen. Zweiseitige ssc sind im Durchschnitt länger als einseitige; zwischen der Anschnittlänge und der Ausbildung eines ssc-Partners im Nachbar-pinealozyten scheint ein Zusammenhang zu bestehen.

In den Schemaskizzen rechts sind schwarz diejenigen ssc-Abschnitte hervorgehoben, die im jeweiligen Histogramm berücksichtigt sind.

P = Pinealozyt.

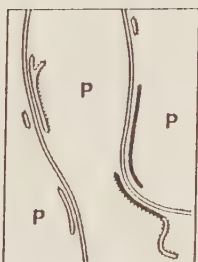
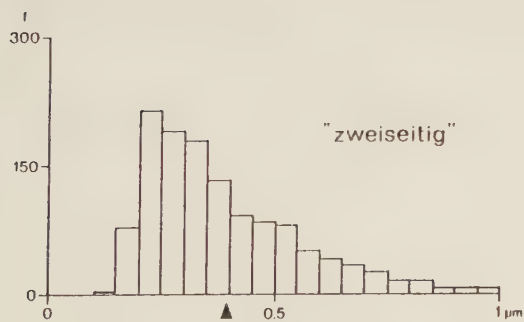
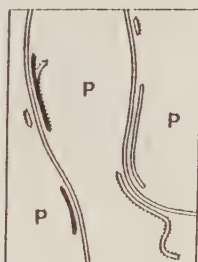
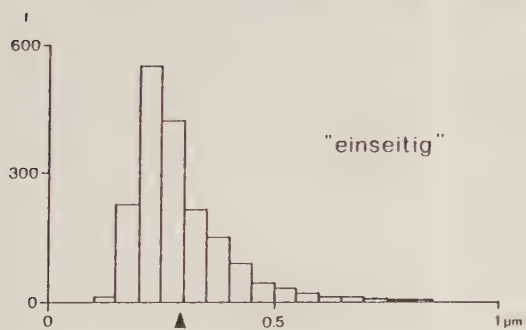


Abb. 22.

Gefrierbrüche durch die Grenzregion von jeweils zwei Pinealozyten.

- a. Bruchrichtung senkrecht zum Verlauf der beiden Pinealozytenmembranen.

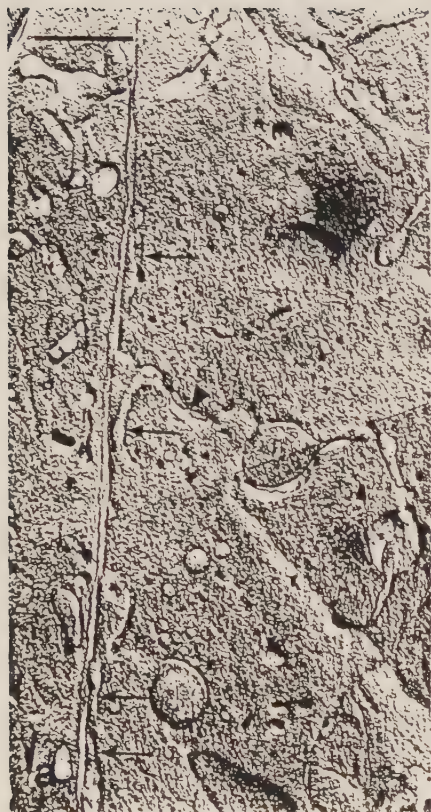
Der Pfeilkopf deutet auf die angebrochene Verbindungen der ssc (Pfeile) mit tiefer im Zytoplasma liegenden eR-Kompartimenten.

- b. Flächige Anbrüche von ssc (Pfeile); die Grenzfläche zwischen den Pinealozyten liegt in der unteren Bildhälfte knapp über, in der oberen Bildhälfte knapp unter der Bruchebene, weshalb die ssc relativ großflächig abgebildet werden. Bei beiden ssc verläuft die Bruchebene in der Lipid-Mittelschicht einer Zisternenmembran. Bei der ssc oben rechts ist die dem Zisternenlumen zugewandte Halbmembran weggebrochen und der Betrachter blickt vom Zisternenlumen aus auf die Bruchfläche (PF = "plasmatic fracture face" nach Bronton et al., 1975). Bei der ssc unten links liegen hinter der Bruchfläche in der Tiefe das Zisternenlumen und die zweite Zisternenmembran. Der Betrachter blickt vom Zytoplasma aus auf das Bruchblatt (EF = "extraplasmatic fracture face" nach Bronton et al., 1975).

Im unteren Pinealozyten sind Golgi-Apparat und Elemente des trans-tubulo-zisternalen Netzwerkes angebrochen, ein eR-Tubulus führt aus diesem Bereich direkt zu einer ssc (Pfeilkopf).

M = Mitochondrium, GA = Golgi-Apparat, K = Kern mit Kernporus.

Der Balken entspricht 0.5 μm .



Zellmembranen. Diese Simultandarstellung ermöglicht die Beurteilung der räumlichen Beziehung von ssc zweier Nachbarzellen. Vereinfachend wird im folgenden nur von ssc gesprochen, die vor bzw. hinter einer "Grenzlamelle" liegen.

Die Lage und der Aufbau der Rekonstruktion werden in den Abb. 7 und 8 demonstriert, das Ergebnis dieser ersten Rekonstruktion zeigt Abb. 23, und zwar die vor (23 a) und die hinter (23 b) der Grenzlamelle lokalisierten ssc und schließlich deren Übereinanderprojektion zur Kennzeichnung von Überlappungen (23 c).

Die Aufsicht auf insgesamt 87 Bezirke, in denen sich das eR nächstmöglich an das Plasmalemm heranschiebt (Abb. 23 a, b), läßt erkennen, daß diese im Schnittbild so einheitlich wirkenden Gebilde nach Gestalt, Verteilung und Größe doch erheblich variieren.

Ihr Aussehen entspricht bei vielen einem einfachen "Antupfen" blindendender eR-Tubuli, andere bilden richtige Zisternen von unregelmäßigem Umriß, einige sind mehrfach gelappt und fenestriert. An den Pinealozytenmembranen wechseln Gebiete nahezu ohne ssc-Besatz mit solchen ab, in denen Zisternen dicht beisammen stehen. Da im Rekonstruktionsbild komplette ssc erfaßt werden, konnte auch darauf geachtet werden, ob im Bereich der zugehörigen Zellmembran andere Verhältnisse herrschen als dort, wo keine Nähe zum eR besteht, etwa in Form von "coated pits" oder von Einstülpungen o.ä.. Derartige nur das Plasmalemm eines Pinealozyten betreffende Besonderheiten wurden nicht festgestellt. Dagegen findet die schon aufgrund von Schnittbildern beschriebene Beziehung von "adhering junctions" zu ssc auch im Rekonstruktionsbild ihren Ausdruck (Abb. 23 d): 6 von 8 beobachteten "adhering junctions" sind in Gebieten großflächiger Zisternen gelegen. In den Bereichen, die völlig frei von Kontakten zwischen Plasmalemm und eR sind, fehlen auch die "adhering junctions" zwischen den Pinealozyten.

Flächenmessungen der rekonstruierten Zisternen bestätigten den Eindruck von zwei distinkten Populationen (Abb. 23): einmal gibt es kleine, rundlich bis ellipsoide Zisternen mit einer durchschnittlichen Fläche von $0.04 \pm 0.03 \mu\text{m}^2$, die lediglich Endknöpfchen von Ausläufern des eR sind und 81% der beobachteten eR-

Annäherungen ausmachen ($n = 71$); von diesen ist deutlich eine Population großer ssc (von stets unregelmäßigem Umriß) unterscheidbar, die eine Fläche von bis zu einem μm^2 erreichen.

Häufigkeit und Grad der Überlappung von Zisternen aus benachbarten Pinealozyten kommen in Abb. 23 c zum Ausdruck. Danach haben beide Populationen "Partner" im Nachbarpinealozyten, jedoch mit unterschiedlicher Häufigkeit: während 11 von 71 (= 14,9%) der kleinen Zisternen ein Pendant in der benachbarten Zelle zeigen, haben bei der Population großer ssc 14 der 16 beobachteten einen Partner; die Überlappungsfläche beträgt 37% der Fläche aller ssc hinter der Grenzlamelle bzw. 34% der Fläche derer vor der Grenzlamelle.

3D-Rekonstruktion der Verbindung von ssc mit Golgi-Apparat.

Hierfür wurde ein Gebiet mit dichtem ssc-Besatz des Plasmalemmas ausgewählt; in unmittelbarer Nachbarschaft befindet sich eine Golgi-Region (Abb. 26 a). Dieser zweite Ausschnitt des Pinealozyten P_1 schließt direkt an die erste Rekonstruktion an (rechts im unteren Drittel von Abb. 7). Einen Eindruck von diesem dichten Maschenwerk aus Röhren und Zisternen vermittelt Abb. 25, im einzelnen werden die Befunde von innen nach außen fortschreitend vorgestellt und betreffen Golgi-Apparat mit trans-tubulo-zister-nalem Netzwerk, rauhem eR und ssc.

An der Transseite des Golgi-Apparates (in sekretorischen Zellen immer der Zellmembran zugewandt, Übersicht bei Pavelka, 1987) finden sich am Rande der Golgi-Zisternen Vesikel von circa 30 nm Durchmesser (Golgi-Vesikel?), die über Ribosomen-freie Tubuli und Zisternen (= trans-tubulo-zister-nales Netzwerk, Rambourg et al., 1979) an reguläre 20 nm-Tubuli des rauhen eR anschließen. Diese Tubuli stehen ihrerseits in offener Verbindung zu ssc (Abb. 26 b). So wird also eine sehr nahe Beziehung der ssc zum Golgi-Apparat hergestellt, wenngleich nicht erwiesenermaßen auch zu dessen Zisternen.

Zur ssc-Bildung tragen daneben auch solche Tubuli bei, die keinerlei Beziehung zum nächstgelegenen Golgi-Apparat erkennen lassen, sondern offensichtlich aus ganz anderen Zellgebieten stammen. Beide Tubulussorten nehmen in dem Raum zwischen Golgi-

Abb. 23.

Rekonstruktion des Grenzbereichs der Pinealozyten P_1 , P_2 und P_3 (vgl. Abb. 7).

Der Zisternenbesatz der Pinealozyten wird mit Hilfe verschiedener Frontalansichten dargestellt. Es wurden nur eR-Kompartimente rekonstruiert, die den für ssc typischen Abstand zum Plasmalemm einhalten.

- a. Aufsicht auf die Grenzlamelle mit den auf der Betrachterseite liegenden Zisternen von P_2 und P_3 (schräg von oben-rechts nach unten-links schraffiert).
- b. Die Zisternen von P_2 und P_3 sind hier nur in Umrissen dargestellt, um einen ungehinderten Blick auf die hinter der Grenzlamelle liegenden Zisternen von P_1 (schräg von oben-links nach unten-rechts schraffiert) zu erlauben.
- c. Schraffur aller Zisternen macht Lage und Ausmaß der Überlappungen kenntlich (Richtung der Schraffuren entsprechend a. und b.)
- d. Räumliche Beziehung von Zisternen (nur Umrisse) zu "adhering junctions" (schwarz); "adhering junctions" treten bevorzugt in der Nähe von großflächigen zweiseitigen ssc auf.



a



b



c



d

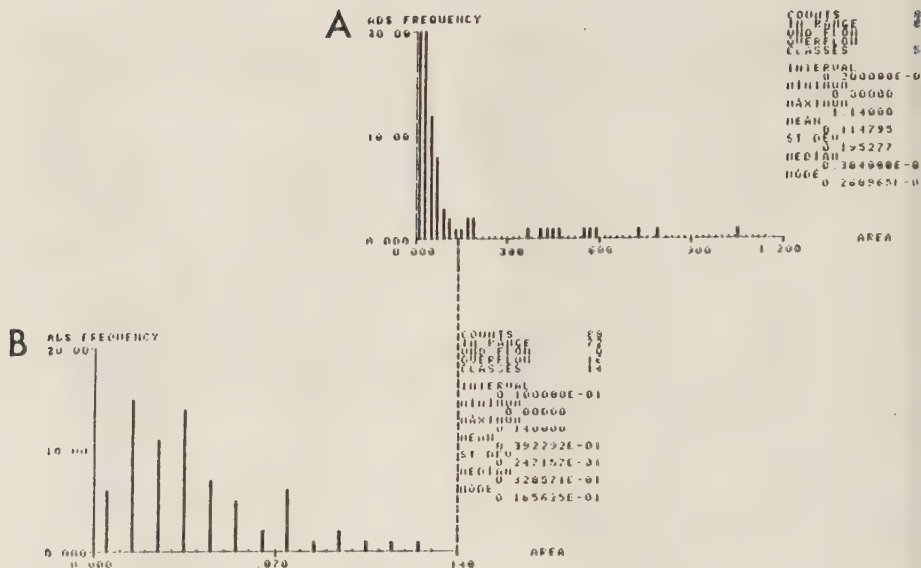


Abb. 24.

Flächenmessung der rekonstruierten, oberflächennahen eR-Anteile. Das Histogramm A zeigt neben der sehr hohen Frequenz sehr kleiner Zisternen eine weite Streuung mittlerer und großer. Diese Frequenzverteilung kann als Überlagerung zweier Verteilungen interpretiert werden; die stärkere Spreizung des Anfangsteiles (Histogramm B) zeigt die Gauss-ähnliche Verteilungskurve der kleinen Zisternen zumindest beim Anstieg zum Maximum bei etwa $0.25 \mu\text{m}^2$. Bei den mittleren und größeren Zisternen reicht die Gesamtzahl nicht zu einer Abschätzung des Verteilungstyps aus.

Zytologisch entsprechen die kleinen Zisternen tupfenförmigen Annäherungen von eR-Tubuli an das Plasmalemm, die mittleren und größeren den eigentlichen ssc.

Apparat und Zelloberfläche teil am Aufbau des eR und verschmelzen unter der Plasmamembran mit ihren Lumina zu einer sehr weitläufigen fenestrierten Zisterne (Abb. 25). Weitere Tubuli bilden kleine Endknöpfe unter der Plasmamembran aus.

Die Lumina aller ssc des Rekonstruktionsgebietes, ob groß oder klein, sind über tubuläre eR-Elemente mit dem Raumnetz in Verbindung, isolierte ssc wurden nicht beobachtet.

Der Abstand der beiden Zisternenmembranen ist konstant 20 nm.

3.2 Experimente

Die Auszählung von Kontaktstellen des eR mit der Pinealozytenmembran, die jeweils als erster Auswertungsschritt direkt am elektronenmikroskopischen Präparat vorgenommen wurde (vgl. 2.4) erbrachte - trotz Auswertung großer Areale - keine signifikanten Gruppendifferenzen, weder unter dem Einfluß eines Hell-Dunkel-Wechsels, noch nach Ganglionektomie, noch nach Kastration bzw. Verabreichung von Testosteron. Deshalb werden diese Maßzahlen bei der Besprechung der Experimente nicht aufgeführt. Rein numerisch ist die Ausbildung solcher Kontakte unter den untersuchten Bedingungen nahezu invariabel; Gruppenunterschiede, die mit unterschiedlichen Funktionszuständen des Pinealozyten korrelieren, finden sich lediglich im Anteil zweiseitiger ssc an deren Gesamtzahl (vgl. 3.2.2).

Gruppenunterschiede werden hauptsächlich beim zweiten Schritt der Auswertung an elektronenmikroskopischen Aufnahmen (vgl. 2.4) erkennbar, wobei kleinstflächige eR-Kontakte ausgeklammert bleiben. Die folgenden Angaben beziehen sich also sämtlich auf ssc, die im Schnitt mindestens 150 nm lang sind.

Abb. 25.

Rekonstruktion der Verbindung ssc und Golgi-Apparat.

Ein Sektor von Pinealozyt P₁ (in Abb. 7 an den ersten Rekonstruktionsbereich nach rechts anschließend) wurde mit Golgi-Apparat und allen eR-Anschnitten mit höherer Auflösung rekonstruiert. Nicht nur oberflächlich liegende ssc, sondern auch die tiefer liegenden eR-Kompartimente sind erfaßt. Strukturen aus Nachbarzellen bleiben unberücksichtigt.

Am Rande des Golgi-Apparates ist ein Übergangsgebiet zum eR ausgebildet, das trans-tubulo-zisternale Netzwerk. Von diesem führen mehrere Tubuli Richtung Plasmalemm und verschmelzen dort zu einer großen, gelappten ssc (dicht gepunktet). Auch eR-Tubuli aus entfernteren Zytosolgebieten münden in diese besonders ausladende ssc ein.

Der Übersichtlichkeit wegen wurden im Bereich des trans-tubulo-zisternalen Netzwerks (Abb. 26) zahlreiche Vesikel weggelassen. Diese Vesikel stehen teils mit den Golgi-Zisternen, teils mit dem eR in offener Verbindung. Die Frage nach einer durchgehenden offenen Verbindung von Golgi-Apparat und eR entzieht sich wegen der im Vergleich zur Schnittdicke geringen Größe dieser Vesikel der Rekonstruktion.

Die Höhe der gesamten Rekonstruktion beträgt etwa 2 μ m.

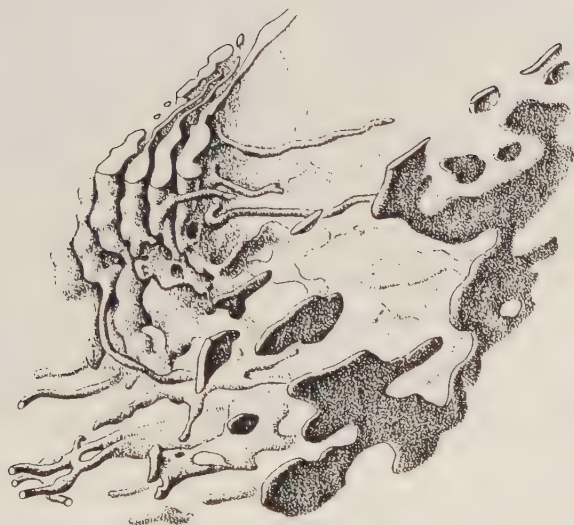


Abb. 26.

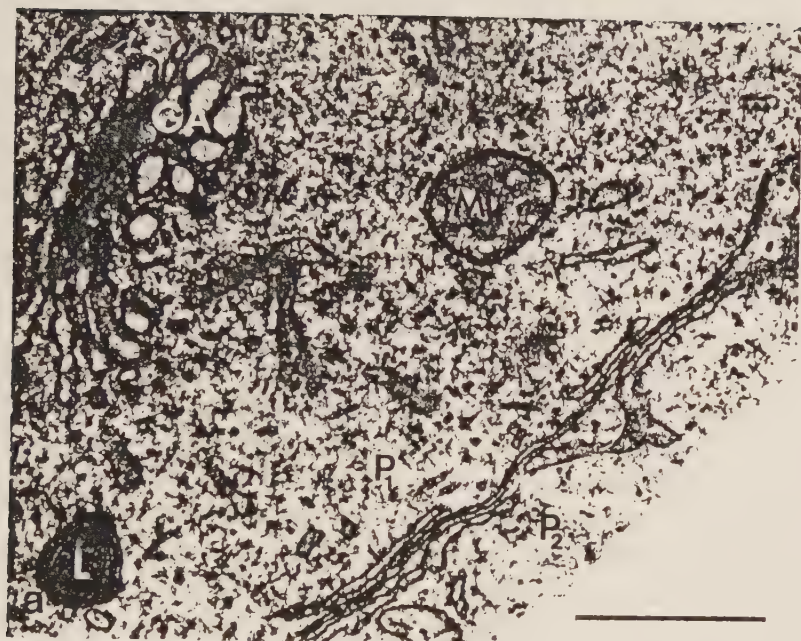
Trans-tubulo-zisternales Netzwerk.

Schnitte, die zur zweiten Rekonstruktion verwendet wurden, zeigen auf zwei verschiedenen Schnittebenen:

- a. Ribosomenfreie Anschnitte des eR im Bereich des trans-tubulo-zisternalen Netzwerkes (*),
- b. einen Vesikel (*) auf der Transseite des Golgi-Apparates, der in offener Verbindung zur ssc steht.

GA = Golgi-Apparat, L = Lysosom, M = Mitochondrium, P₁ und P₂ die beiden Pinealocyten, Zk = Zellkontakt ("adhering junction").

Der Balken entspricht 0.5 μ m.



3.2.1 Diurnale Veränderungen

Aus Tab. 1 ist zu ersehen, daß zu verschiedenen Tageszeiten im relativen Besatz der Pinealozytenmembran mit ssc (Länge ssc pro Länge Plasmalemm) und in der Zahl der ssc keine nennenswerten Differenzen auftreten, wohl aber in der Länge dieser ssc.

Die durchschnittlich längsten ssc treten um 12 bzw. 16 h auf, die kürzesten um 4 h (Abb. 27). Das Powerspektrum aus der Fourieranalyse zeigt für die Längenveränderung eine Periode von etwa 24 Stunden an, also ein diurnales Ereignis (Abb. 28).

Wie stark dieser Tagesgang durch die zweiseitigen ssc bestimmt wird, zeigt die entsprechende Aufschlüsselung in Abb. 29. Danach ist die diurnale Längenschwankung bei einseitigen ssc gerade eben angedeutet, stark ausgeprägt hingegen bei zweiseitigen ssc und deren Überlappungslänge: ein deutlicher Anstieg der gemessenen Längen erfolgt jeweils in der Mitte der Hellphase, in der ersten Stunde nach "Licht aus" werden die Zisternen bereits kürzer und erreichen die niedrigsten Werte in der zweiten Hälfte der Dunkelphase. Die strenge Parallelität dieser beiden Zeitverläufe deutet auf eine enge Wechselbeziehung zwischen Länge und Zweiseitigkeit von ssc (vgl. Abb. 21).

Der Anteil zweiseitiger Zisternen am Gesamtbestz der Pinealozytenmembran mit ssc unterliegt keinen signifikanten diurnalen Veränderungen.

Tab. 1. Morphometrische Werte der ssc nach Bild-Auswertung.

Parameter	Tages- zeit	$\bar{x}$	$\pm$	s	Varianz- analyse
Länge ssc pro Länge Plasmalemm (%)	24 h	5.50		1.41	nicht signi- fikant
	4 h	5.22		1.23	
	8 h	5.74		1.14	
	12 h	6.59		1.61	
	16 h	5.80		1.55	
	20 h	5.92		1.32	
	24 h	5.50		1.41	
Zahl ssc pro 10 μm Plasmalemm	24 h	1.75		0.39	nicht signi- fikant
	4 h	1.70		0.39	
	8 h	1.66		0.29	
	12 h	1.85		0.36	
	16 h	1.52		0.33	
	20 h	1.59		0.32	
	24 h	1.75		0.39	
Länge ssc (μm)	24 h	0.33		0.05	0.001
	4 h	0.31		0.03	
	8 h	0.34		0.02	
	12 h	0.38		0.04	
	16 h	0.38		0.03	
	20 h	0.37		0.04	
	24 h	0.33		0.05	

Abb. 27.

Diurnale Längenänderung der Zisternenanschnitte.

Jeder Punkt repräsentiert die bei einem Tier gefundene mittlere Zisternenlänge. Acht Tiere wurden pro Zeitpunkt untersucht, deren interindividuelle Mittelwerte sind durch die sinusartige Kurve verbunden.

Pfeile weisen auf die signifikant unterscheidbaren Zeitgruppen hin und geben die Irrtumswahrscheinlichkeit an (U-Test nach vorheriger Varianzanalyse). Die Dunkelzeit ist durch Querstreifung markiert.

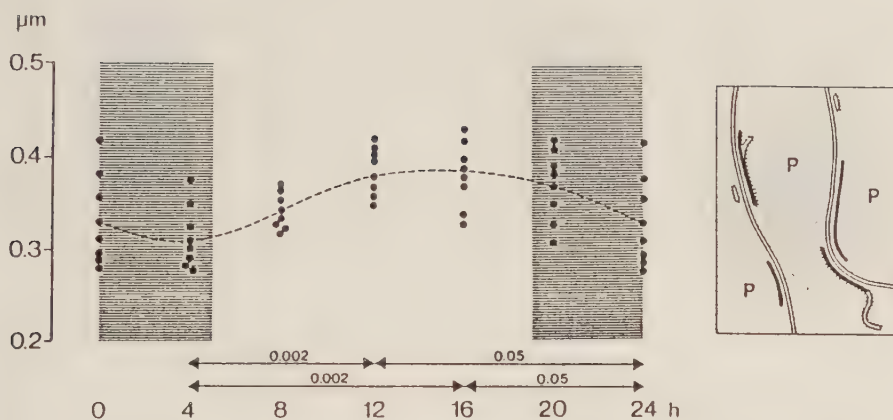
In der Schemaskizze rechts sind schwarz die in der Auswertung berücksichtigten ssc-Abschnitte hervorgehoben.

P = Pinealozyt.

Abb. 28.

Powerspektrum aus der Fourieranalyse der 54 Einzeldaten.

Bei der Periode von 24 Stunden ist ein ausgeprägter Gipfel vorhanden, die Länge der ssc weist also tatsächlich eine diurnale Rhythmik auf.



POWER SPECTRUM

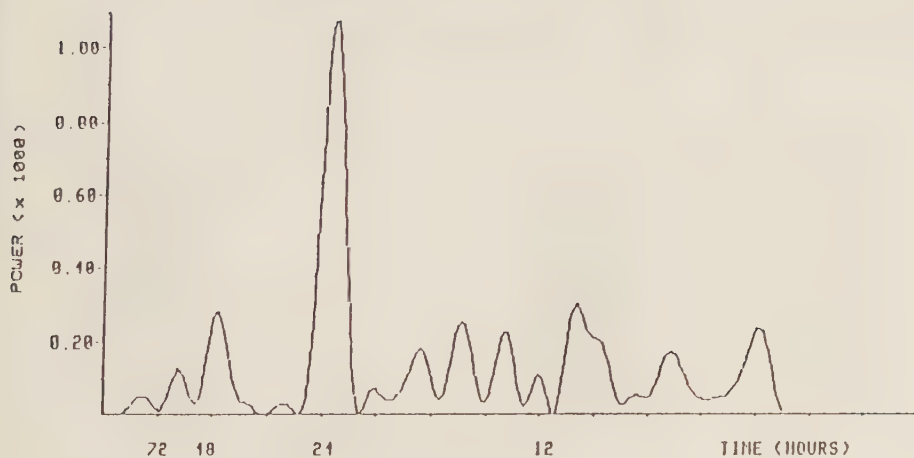


Abb. 29.

Diurnale Längenänderungen von

oben: einseitigen ssc,

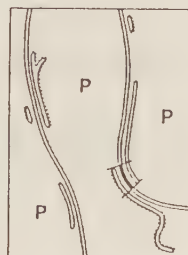
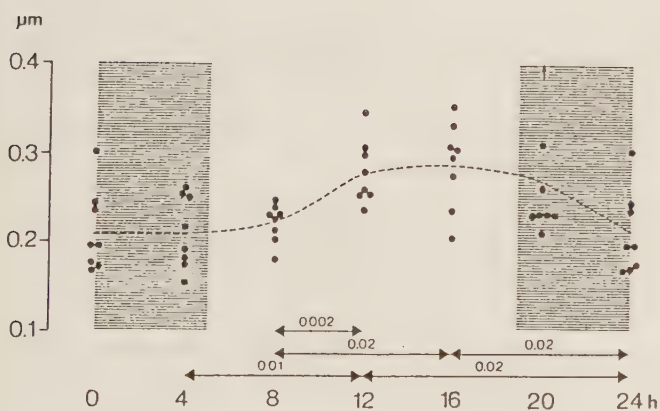
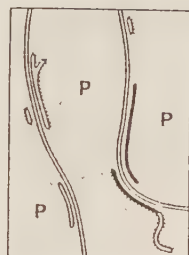
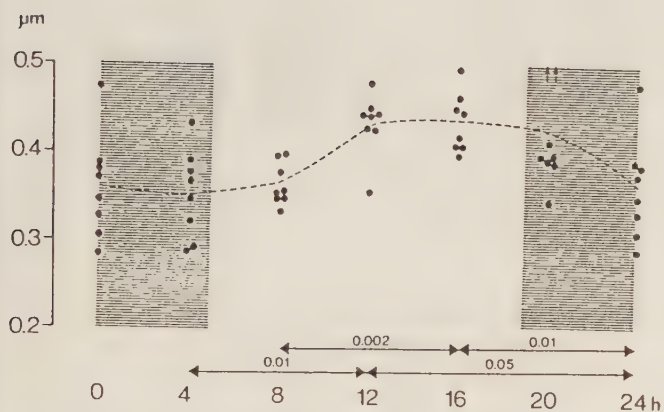
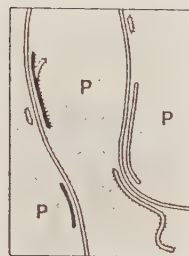
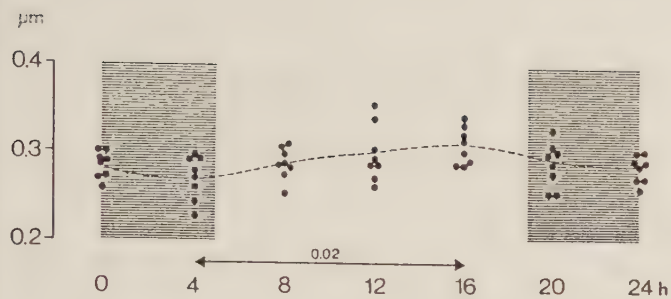
Mitte: zweiseitigen ssc,

unten: Überlappung bei zweiseitigen ssc.

Die ausgeprägte Tagesperiodik in der Länge aller ssc (Abb. 27) spiegelt sich in der Verteilung der Längenwerte einseitiger ssc nur geringgradig wider, sehr deutlich hingegen in der Verteilung der Längenwerte zweiseitiger ssc und ihrer Überlappungslängen.

In den Schemaskizzen rechts sind schwarz diejenigen ssc-Abschnitte hervorgehoben, die in der jeweiligen Graphik berücksichtigt sind.

Die Darstellung entspricht der in Abb. 27.



3.2.2 Bilaterale Exstirpation des Ganglion cervicale superius

Die Entfernung der sympathischen Affferenz und damit der Hauptinnervation des Pinealorgans durch Ganglionektomie (scgx) wirkte sich auf die ssc in folgender Weise aus (Abb. 30):

Die Dichte des Besatzes der Pinealozytenmembranen mit ssc ist um 35% gegenüber Kontrolltieren verringert; das kommt bei nahezu unveränderter durchschnittlicher Länge der Zisternenanschnitte durch eine Reduktion der ssc-Zahl bei den ganglionektomierten Tieren um 37% zustande ($p = 0.01$).

Der Anteil zweiseitiger ssc an der Gesamtzisternenanzahl war bei ganglionektomierten Tieren mit durchschnittlich 16.9% gegenüber der Kontrollgruppe (21.5%) nicht signifikant verändert.

Die Auswertung aller eR-Kontaktstellen, die im ersten Auswertungsschritt erfolgte, zeigte bei unveränderter Anzahl von Kontakten eine signifikante Verringerung des Anteiles zweiseitiger Zisternen ($p = 0.01$).

Anteil zweiseitiger Zisternen an der Gesamtzahl eR-Kontakte (%)

Kontrolltiere	10.3	$\pm$ 6.2
scgx-Tiere	6.2	$\pm$ 2.0

Scheinoperierte Tiere ($n = 6$) unterscheiden sich in keinem der betrachteten ssc-Parameter von den Kontrolltieren.

Da das Pinealorgan gonadotrop wirken kann, wurden das Hodengewicht und die Fläche der vom Steroidhormon-Spiegel abhängigen Markierdrüse (Thiessen & Yahr, 1977) bei den ganglionektomierten Tieren beobachtet. Es war (bei den untersuchten Langtagtieren) kein Unterschied zur Kontrollgruppe festzustellen:

	Hodengewicht (g)			Markierdrüsenfläche (mm ²)		
Kontrolltiere	1.2	$\pm$	0.1	141.5	$\pm$	21.7
scgx-Tiere	1.2	$\pm$	0.1	142.3	$\pm$	20.8

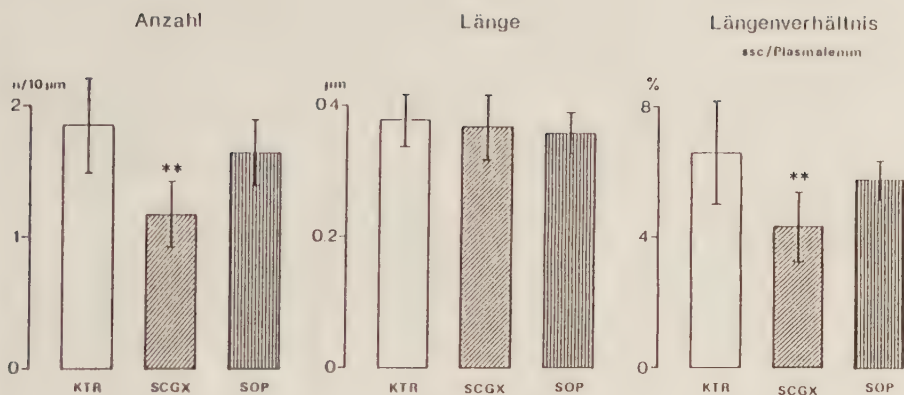


Abb. 30.

Ssc-Besatz der Pinealozytenmembranen nach beidseitiger Exstirpation des Ganglion cervicale superius.

Morphometrische Werte von

links: Kontrolltieren (KTR, weiße Säulen),

Mitte: bilateral ganglionektomierten Tieren (SCGX, schräg schraffierte Säulen), und

rechts: scheinoperierten Tieren (SOP, vertikal gestreifte Säulen).

Nur in der Anzahl, nicht in der durchschnittlichen Länge zeigen ganglionektomierte Tiere eine deutliche Reduktion ($p = 0.01$) im Vergleich zu beiden anderen Tiergruppen. Dadurch sinkt der von ssc unterfütterte Anteil der Pinealozytenmembran um rund ein Drittel.

Mittelwerte und Standardabweichung von je 8 bzw. bei SOP von 6 Tieren.

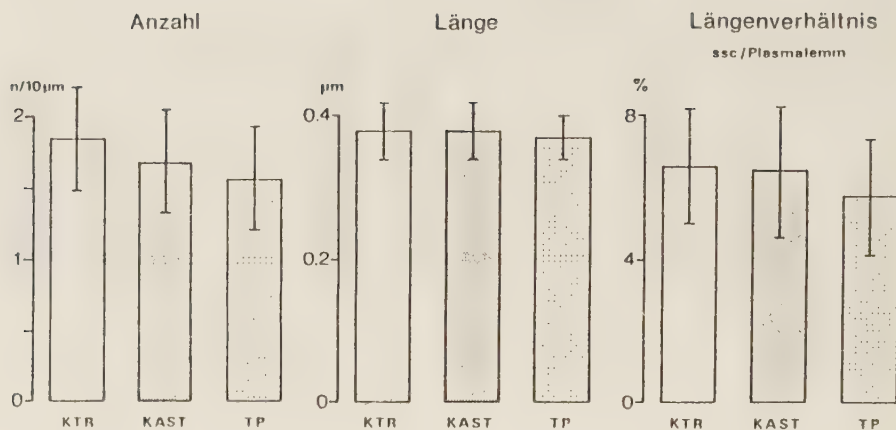


Abb. 31.

Ssc-Besatz der Pinealozytenmembranen nach Kastration bzw. Kastration und Hormonsubstitution.

Morphometrische Werte von

links: Kontrolltieren (KTR, weiße Säulen),

Mitte: kastrierten Tieren (KAST, dicht gepunktete Säulen), und

rechts: kastrierten Tieren nach Substitution von Testosteron-Propionat (TP, locker gepunktete Säulen).

Kastration und Hormonsubstitution bleiben ohne erkennbare Wirkung auf die ssc der Pinealozyten.

Mittelwerte und Standardabweichung von je 8 Tieren.

3.2.3 Kastration und Substitution mit Testosteronpropionat

Am Zustand von Organen, deren Funktion von Hormonen der Keimdrüsen abhängt, können die Auswirkungen der Kastration ebenso wie der Erfolg von substituiertem Testosteron abgelesen werden: die Abb. 6 zeigt, wie sowohl das Gewicht des Komplexes aus Bläschen-drüse und Prostata als auch die Fläche der ventralen Markierdrüse in der Folge der Kastration stark reduziert, unter dem Einfluß von Testosteronpropionat aber restituiert werden.

Betrachtet man die ssc der Pinealozyten, so findet weder die Entfernung der Keimdrüse noch die Zuführung von exogenem Testosteron erkennbaren Ausdruck: Zahl, Länge und folglich auch die prozentuale Besatz der Pinealozytenmembran mit ssc bleiben invariant (Abb. 31).

3.3 Histochemischer Nachweis von Kalzium

3.3.1 Komplexbildung mit Osmium-Blutlaugensalz im Pinealorgan

Durch die Perfusion der Versuchstiere unter Kalzium-Protektion und die Nachfixierung mit Ferrocyanid-reduziertem Osmium werden Stellen hoher extrazellulärer Kationenkonzentrationen durch polymere, kolloidale OsFeCN -Komplexe markiert (Forbes et al., 1977). In den Interzellularräumen zwischen Pinealozyten und Gliazellen sind homogene elektronendichte Niederschläge vorhanden (Abb. 32). Die extrazellulären Räume im Pinealorgan, die zwischen den Zellen der bindegewebigen Kapsel oder zwischen Kapillar-Endothelzellen und umgebenden Perizyten liegen, sind frei von elektronendichten Komplexen.

Intrazellulär wurden im gesamten Pinealorgan keine OsFeCN -positiven Markierungen beobachtet: das Lumen der eR-Kompartimente in den Pinealozyten ist nicht mit elektronendichtem Material erfüllt, ihre Membranen zeigen keine Kontrastverstärkung, auch in den knapp unter der Plasmamembran liegenden ssc war keine Reaktion zu beobachten (Abb. 32 b).

Abb. 32.

Komplexbildung mit Osmium-Blutlaugensalz.

Elektronendichte Niederschläge in den Interzellularräumen des Pinealorgans durch OsFeCN-Komplexe zeigen eine starke Anreicherung mit Kalziumionen. Die Markierungen lassen die Verflechtung der Pinealozytenausläufer deutlich hervortreten.

a. Übersicht über mehrere Pinealozyten und ihre Ausläufer.

Der Balken entspricht 5 μm .

b. Ausschnitt an der Grenze zweier Pinealozyten mit schwarz erfülltem Interzellularspalt und deutlich erkennbaren großen zweiseitigen ssc (Pfeile); in denen weder im Lumen noch an den Membranen OsFeCN-Komplexe lokalisiert sind.

Der Balken entspricht 0.5 μm .

G = Gliazelle; K = Kern; P = Pinealozyt; * = Zellkontakt



3.3.2 ATP-abhängige Ca^{2+} -Akkumulation in den ssc

Kalzium-sequestrierende Organellen sind fähig, aus einem Medium mit eingestelltem Ca^{2+} -Gehalt unter ATP-Verbrauch Kalziumionen aufzunehmen (Wakasugi et al., 1982 und Walz, 1982 und pers. Mitteilung), vgl. auch die Reaktion in den Skelettmuskelfasern (Abb. 7). Um das Kalziumangebot bis an die intrazellulären Organellen heranzuführen, muß die Zellmembran mit Saponin permeabilisiert werden (vgl. 2.8.2).

Offenbar sind die Cholesterin-armen intrazellulären Membransysteme vom Abbau durch Saponin weniger betroffen als die Plasmamembran, sodaß die Erhaltung der Feinstruktur der Pinealozyten ausreichte, um die Niederschläge lokalisieren zu können (Abb. 33).

In Pinealozyten konnte eine intrazelluläre Anreicherung mit Kalziumionen erreicht werden, die anschließende Oxalatfällung zeigt die Orte der Anreicherung. Das Kalziumoxalat findet sich nicht frei im Zytosol, sondern an Organellen gebunden, und zwar an Mitochondrien und an Elementen des eR. Die ssc weisen deutliche Kalziumoxalat-Niederschläge auf (Abb. 33).

3.3.3 Kalziumlokalisation mit Pyroantimonat

Im Pinealorgan treten nach Fixierung mit Kaliumpyroantimonat (PPA)-haltigen Lösungen (vgl. 2.8.3) bei guter Gewebeerhaltung elektronendichte Kalziumantimonat-Niederschläge auf, sowohl extra- wie intrazellulär.

Die intrazelluläre Reaktion erfolgt nicht gleichmäßig im gesamten Pinealorgan, ohne daß allerdings in der Verteilung der Reaktionsorte irgendeine Regelhaftigkeit zu erkennen wäre; dieses Phänomen ist bei der angewandten Kalzium-Nachweis-Methode auch in anderen Organen beobachtet worden (Wick & Hepler, 1982).

Das Interstitium um Pinealozyten mit intrazellulären Niederschlägen ist im allgemeinen frei von elektronendichtem Material, außer wenn dieser Raum in unmittelbarer Nähe eines extrazellulären Acervulus liegt (s. u.).

Extrazelluläre Kalziumanreicherungen:

Spezifische PPA-Niederschläge treten regelmäßig in den Bereichen um die Corpora arenacea oder "reifen" Acervuli auf. Diese Kalkkonkretionen entstehen zunächst durch Kalzifizierung einer intrazellulären Vakuole im Pinealozyten als "unreifer" Acervulus (vgl. 1.1 und Abb. 15). Nach dem Absterben des Pinealozyten liegt die Konkretion im Interstitium und wächst durch konzentrische Anlagerung von nadelförmig kristallisiertem Hydroxyapatit weiter (Welsh & Reiter, 1978, Welsh, 1984). Diese extrazellulären Acervuli werden durch die PPA-Methode sehr stark elektronendicht markiert. Die interstitiellen Spalten zwischen den umgebenden Pinealozyten sind mit Kalzium-Antimonat-Niederschlägen erfüllt; diese Niederschläge nehmen an Zahl und Größe in Richtung auf die Acervuli hin zu (Abb. 34), sie zeigen keinerlei tageszeitliche Variation.

Intrazelluläre Kalziumantimonat-Niederschläge:

Pinealozyten.

An den Pinealozytenmembranen sind keine grobkörnigen Niederschläge zu beobachten, wie sie am Axolemm der Neuriten im Pineale vorkommen (Abb. 14); auch die Plasmalembereiche, die mit ssc belegt sind, zeigen keine Niederschläge.

Frei im Zytosol kommen nahezu keine Reaktionsprodukte vor, sie finden sich in Organellen und haften an deren Membranen. Vereinzelt können grobkörnige und - ab 20 000-facher Vergrößerung - Ansammlungen sehr feinkörniger Niederschläge beobachtet werden, wobei das grobkörnige Material intrazellulär nahezu ausschließlich im Zellkern gefunden wird.

Die Anschnitte von eR-Kompartimenten in den Pinealozyten sind dicht von feinkörnigem Reaktionsprodukt erfüllt. Dadurch kommen die Perinuklearzisternen deutlich zur Darstellung und erleichtern die Orientierung auf den unkontrastierten Schnitten (Abb. 35). Die Kalziumantimonatsalze sind in den Zisternen des eR kontinuierlich vom Kernbereich bis zu den unter den Plasmamembranen liegenden ssc zu verfolgen (Abb. 36 a und b). Die unter der Pinealozytenmembran gelegenen ssc enthalten in gleichem Umfang

Abb. 33.

Nachweis der aktiven Ca^{2+} -Aufnahme.

In Organellen, die unter ATP-Verbrauch Kalziumionen akkumulieren, werden Kalzium-Oxalate ausgefällt. Für diese Reaktion müssen vorher die Zellmembranen permeabilisiert werden. Reaktionsprodukt findet sich in den Mitochondrien und in verschiedenen eR-Kompartimenten, u.a. in

a. ssc,

b. der perinukleären Zisterne (*).

K = Kern, M = Mitochondrium; Pfeile deuten auf ssc.

Der Balken entspricht 1 μm .



Abb. 34.

Interstitium in unmittelbarer Nähe eines extrazellulären Acervulus.

Grobkörnige Niederschläge liegen im Interstitium des Pinealorgans nach Fixierung mit der PPA-Methode, sie nehmen in Richtung auf den extrazellulären Acervulus zu. (Der Acervulus selbst läge im Bild unten, ist aber während des Schneidens ausgebrochen).

A = erweitertes Interstitium, in dem der Acervulus liegt;

M = Mitochondrium; Pfeilkopf deutet auf das Interstitium um einen sehr feinen Ausläufer.

Der Schnitt ist unkontrastiert.

Der Balken entspricht 0,5 μm .

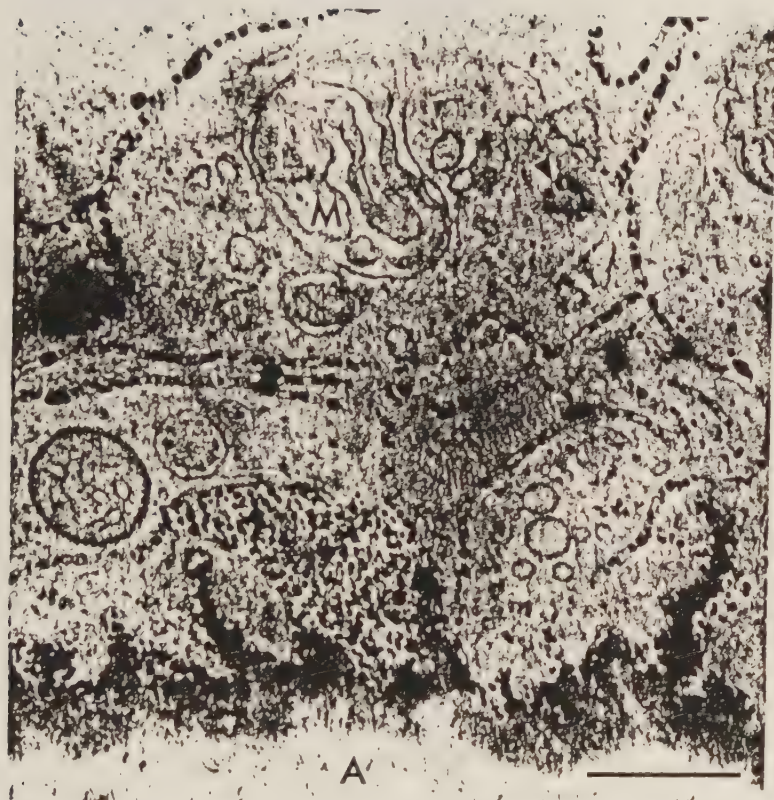


Abb. 35.

Kalziumantimonat-Niederschläge im Pinealozyten.

Einige grobkörnige Niederschläge befinden sich im Karyoplasma des großen, gelappten Zellkerns; die perinukleäre Zisterne, die ssc und die übrigen Anschnitte von eR-Kompartimente sind von feinem Niederschlag erfüllt. Die Interzellularräume (Pfeilkopf) sind niederschlagsfrei.

A = unmyelinisiertes Axon, K = Kern; der markierte Ausschnitt ist in Abb. 36 a in stärkerer Vergrößerung abgebildet.

Der Schnitt ist unkontrastiert.

Der Balken entspricht 1 μm .



Abb. 36.

Kalziumantimonat-Niederschläge in ssc.

Die eR-Kompartimente sind mit feinem Niederschlag erfüllt, auch in den ssc wird lose gebundenes Kalzium ausgefällt (Pfeile); Reaktionsprodukte aus verschiedenen Versuchsdurchgängen sind abgebildet.

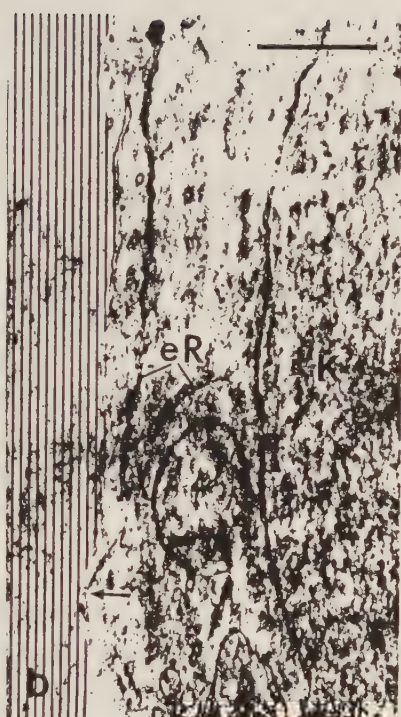
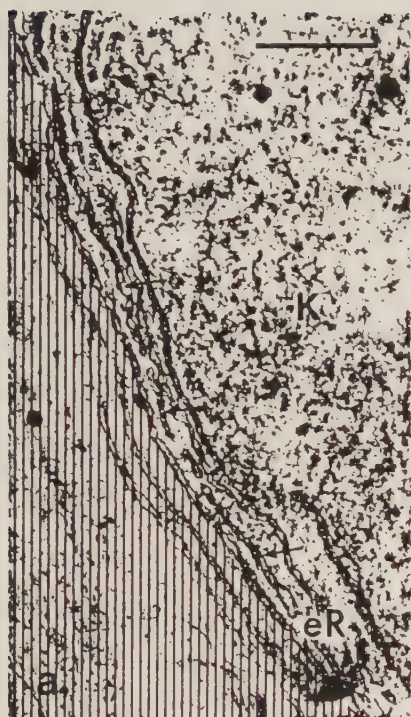
Das Interstitium ist niederschlagsfrei und die Mitochondrien zeigen keine auffällige Anreicherung von elektronendichtem Niederschlag.

- a. Detail aus Abb. 35: nicht zum markierten Pinealozyten gehörender Bereich schraffiert; durch Reaktionsprodukt markiert sind ssc, Perinuklearzisterne und eine weitere eR-Zisterne.
- b. Feines Reaktionsprodukt erfüllt eine ssc und ihre nahezu kontinuierliche Verbindung zur Perinuklearzisterne. Nicht zu diesem Pinealozyten gehörender Bereich schraffiert.
- c. Schräg durch das untere Bilddrittel verlaufende Grenze zweier Pinealozyten; markiert sind ssc (Pfeile) und in beiden Zellen zahlreiche weitere Anschnitte des eR.

eR = endoplasmatisches Retikulum, K = Kern, M = Mitochondrium.

Die Schnitte sind unkontrastiert.

Der Balken entspricht 0,5 μm .



Niederschläge, wie die übrigen Anschnitte des eR. Die elektronendichten Niederschläge haften an den Membranen der Tubuli und Zisternen des eR und sind auch in den Lumina verteilt (besonders deutlich in Abb. 36 b).

Auch die gelegentlich in den Pinealozyten vorkommenden "concentric lamellar bodies" (wie sie in Neuronen beschrieben worden sind; Heym & Addicks, 1982), konzentrisch angeordnete, ribosomenfreie eR-Blätter, sind gleichmäßig mit Kalziumantimonatsalz-Niederschlägen erfüllt (Abb. 37).

In den Zisternen der Golgi-Apparate scheint ein Gradient in der Niederschlagsdichte zu bestehen: während an der Cis-Seite so gut wie keine Reaktionsprodukte vorhanden sind, kann man an der Trans-Seite einen feinen Niederschlag erkennen, in ähnlichem Umfang wie in eR-Anschnitten.

Die Mitochondrien weisen weder in ihren Matrizizen, noch an den Membranen Kalziumantimonat-Ansammlungen auf (Abb. 36 und 39).

Gliazellen.

Die Ansammlung von Kalziumantimonatsalzen in den verschiedenen Kompartimenten des eR ist weniger ausgeprägt, vor allem die bei den Pinealozyten so auffällige dicht erfüllte perinukleäre Zisterne ist kaum durch elektronendichte Niederschläge markiert (Abb. 38). Ssc werden in Gliazellen nicht gebildet (s.o.).

3.3.4 Diurnale Veränderung in der intrazellulären Ca^{2+} -Verteilung

Die oben beschriebene Verteilung der Niederschläge in der Zelle gilt für alle während der Hellphase fixierten Tiere. Wurden die Tiere in der Mitte ihrer Dunkelphase fixiert, so unterscheidet sich die intrazelluläre Lokalisation der Kalziumantimonate folgendermaßen:

Im Karyoplasma der Pinealozyten treten vermehrt grobkörnige und auch feinkörnige Niederschläge auf (Abb. 39 a). Der Bereich des Nukleolus wird durch feines Reaktionsprodukt markiert (Abb. 39 b). In den verschiedenen eR-Kompartimenten fehlt jeglicher Niederschlag (Abb. 39): weder in der perinukleären Zisterne, noch in den ssc sind Ansammlungen elektronendichten Materials zu finden.

Das axoplasmatische Retikulum der myelinisierten und unmyelinisierten Nervenfasern im Pinealorgan ist ebenfalls sehr niederschlagsarm (vgl. Abb. 14), lediglich die grobkörnigen Reaktionsprodukte, die am Axolemm anliegen, sind auch in der Dunkelphase in gleichem Maße vorhanden.

Niederschlagverteilung nach Lichtexposition während der Dunkelphase:

Die circadiane Rhythmik der Syntheseleistung des Pinealorganes wird gestört, wenn die Individuen während der Dunkelphase hellem Licht ausgesetzt werden, die Melatoninsynthese wird sofort unterbrochen (Illnerova et al., 1978).

Nach einer Stunde Lichtexposition: Über den Zellkernen liegt der für nächtliche Versuchstiere beschriebene grobkörnige Niederschlag, in der perinukleären Zisterne hingegen sind vereinzelt Spuren feinkörniger Reaktionsprodukte zu erkennen.

Nach zwei Stunden Lichtexposition: In einigen Pinealozyten sind deutliche Ansammlungen feinkörniger Antimonsalzniederschläge in der perinukleären Zisterne und auch in den SSC zu erkennen. Die grobkörnigen Reaktionsprodukte im Karyoplasma sind nach wie vor zu beobachten. Die Füllung der eR-Kompartimente mit feinkörnigem Niederschlag erscheint etwas weniger dicht als bei den in der Hellphase präparierten Pinealorganen (Abb. 40).

Abb. 37.

"Concentric lamellar body".

Die konzentrisch aufgerollte eR-Zisterne ist in ihrem gesamten Anschnitt gleichmäßig mit feinkörnigem Kalziumantimonat-Niederschlag erfüllt.

Der Schnitt ist unkontrastiert.

Der Balken entspricht 0,5 μm .

Abb. 38.

Kalziumantimonat-Niederschlag in einem Pinealozyten und einer benachbarten Gliazelle.

In den eR-Kompartimenten, v.a. in der perinukleären Zisterne der Gliazelle ist keine auffällige Niederschlagsdichte zu beobachten, während im Pinealozyten die eR-Anteile durch die Füllung mit elektronendichten Reaktionsprodukten markiert sind. Der Pfeil weist auf eine ssc des Pinealozyten.

G = Gliazelle, P = Pinealozyt.

Der Schnitt ist unkontrastiert.

Der Balken entspricht 0,5 μm .



Abb. 39.

Kalziumantimonat-Niederschläge im Pinealorgan von Nacht-Tieren.

- a. Anders als bei Tag-Tieren finden sich keine feinkörnigen Niederschläge in den verschiedenen Kompartimenten des eR, jedoch größere Ansammlungen grober elektronendichter Reaktionsprodukte im Karyoplasma. Die perinukleäre Zisterne zieht diagonal von links-unten nach rechts-oben durch das Bild.
- b. Der Nukleolus wird von feinem Reaktionsprodukt nachgezeichnet.
- c. Unten im Bild ein intrazellulärer Acervulus, die Schwärzung seiner Kristallnadeln belegt die Fällungsreaktion; ssc an Pinealozytengrenzen enthalten keine Kalziumpräzipitate.

A = intrazellulärer Acervulus, K = Kern, M = Mitochondrium; die Pfeile deuten auf ssc.

Die Schnitte sind unkontrastiert.

Der Balken entspricht 0,5 μm .

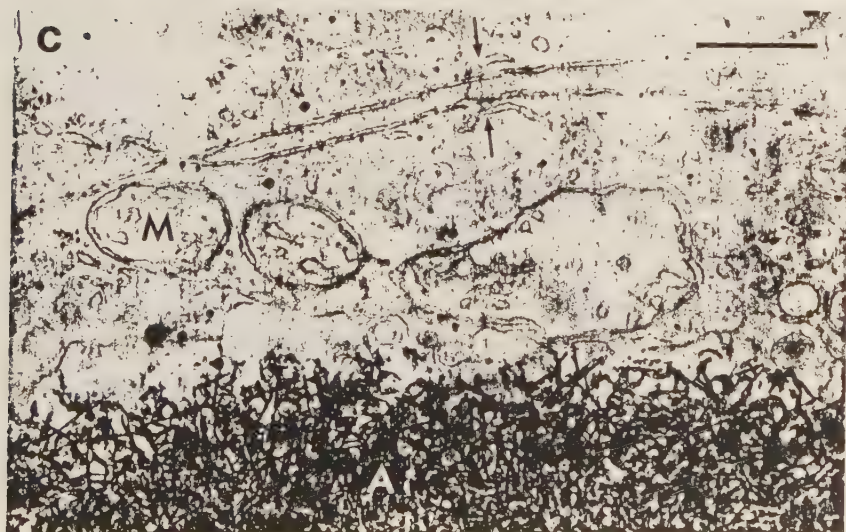
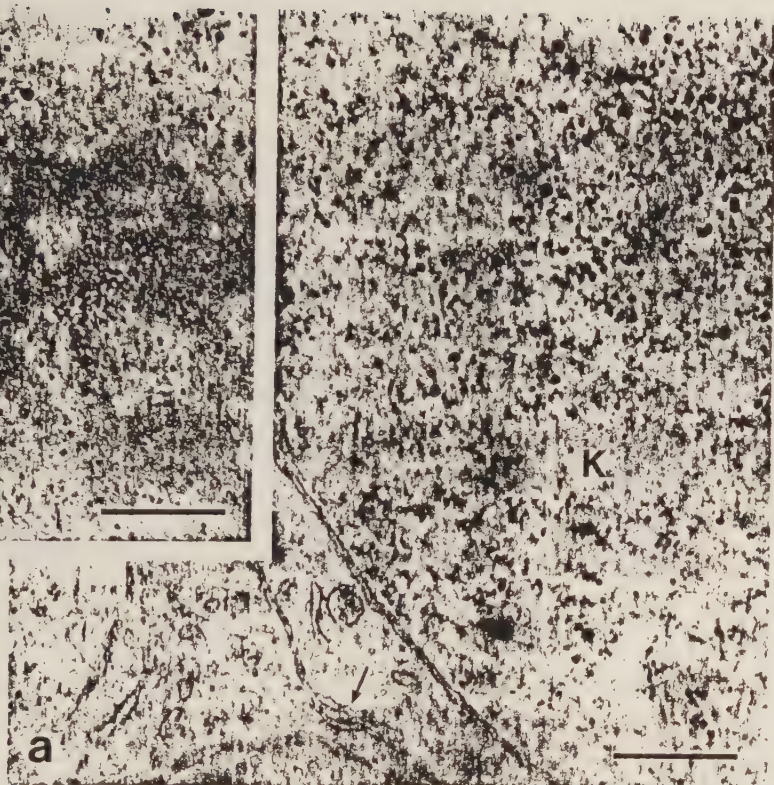


Abb. 40.

Wirkung von nächtlicher Lichtexposition.

Die Versuchstiere wurden in der Mitte der Dunkelphase für zwei Stunden hellem Licht ausgesetzt. In den ssc der Pinealozyten ist deutlich feinkörniger Kalziumantimonat-Niederschlag vorhanden, ebenso in der perinukleären Zisterne und in weiteren eR-Anschnitten (ähnlich wie bei Tag-Tieren).

K = Kern; die Pfeile weisen auf ssc.

Der Schnitt ist unkontrastiert.

Der Balken entspricht 0,5 μm .

Abb. 41.

Blockierung der Kalziumausschüttung mit Dantrolen.

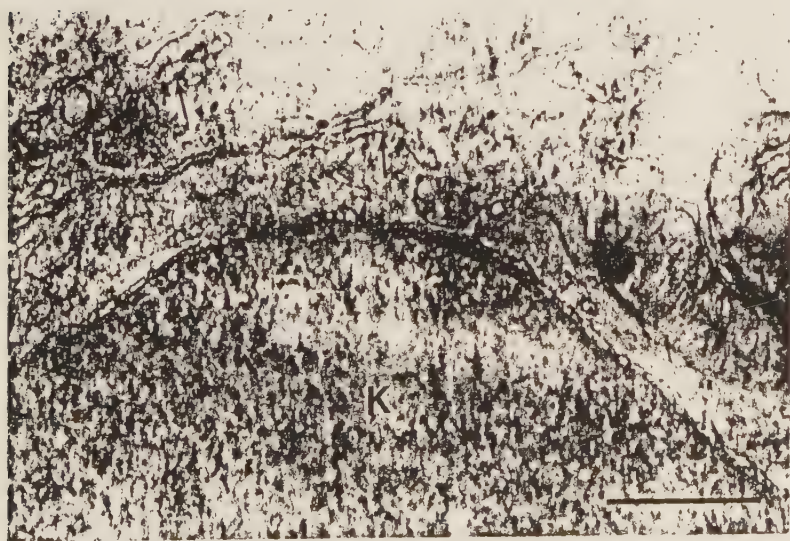
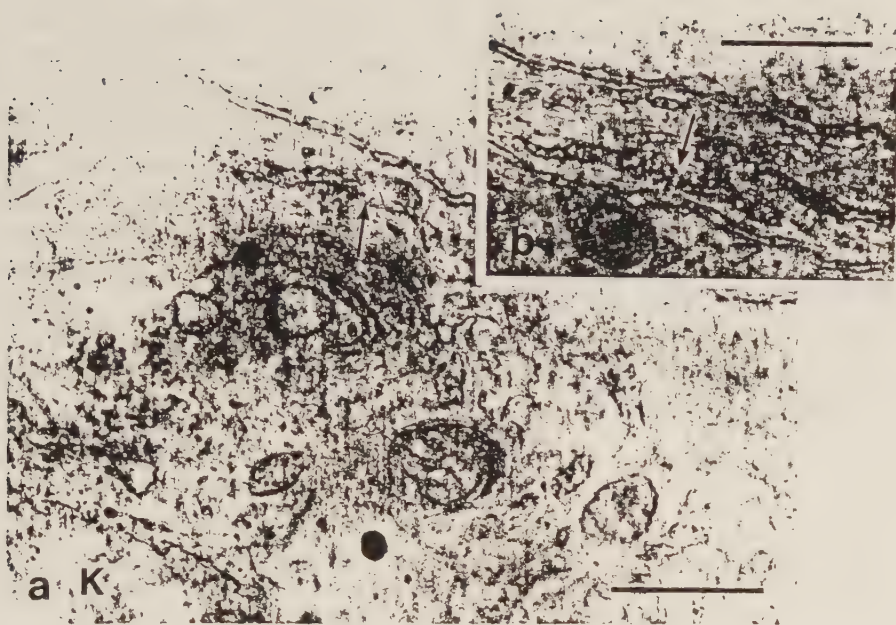
Den Versuchstieren wurde in der Hellphase Dantrolen injiziert, die Fixierung erfolgte in der Dunkelphase. Die etwas angeschwollenen eR-Kompartimente sind erfüllt von feinkörnigem Niederschlag (ähnlich wie bei Tag-Tieren).

- a. Bereich eines Pinealozyten-Perikaryon, zahlreiche eR-Anschnitte sind markiert.
- b. Längere ssc in einem Pinealozytenausläufer.

K = Kern; Pfeile weisen auf ssc.

Der Schnitt ist unkontrastiert.

Der Balken entspricht 0,5 μm .



3.3.5 Einfluß von Dantrolen-Natrium

Dantrolen-Natrium hemmt in Muskelzellen die Freisetzung von Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Produktinformation). Nach i.p. Applikation der Substanz am Ende der Hellphase und Untersuchung der Pinealorgane in der Mitte der Skotophase führt Dantrolen im Pinealozyten eine den Tagverhältnissen ähnliche Verteilung der PPA-Niederschläge herbei (vgl. Abb. 41):

Die - etwas erweiterten - eR-Kompartimente sind mit Kalziumantimonat-Niederschlag erfüllt, entsprechend den während der Hellphase fixierten Pinealorganen. Die ssc, ebenfalls mit etwas erweitertem Lumen, sind mit feinkörnigem Niederschlag erfüllt. Die im Karyoplasma liegenden grobkörnigen Niederschläge sind im Vergleich zu unbehandelten Nachttieren reduziert.

4. Diskussion

4.1 Morphologie

Im Pinealorgan von *Meriones unguiculatus* wurden ssc ausschließlich in Pinealozyten, nicht in der Glia gefunden. Das deckt sich mit Berichten aus dem Cortex (Reyners et al., 1977), aus dem Hypothalamus (Suarez et al., 1983) und aus der Retina (Fisher & Goldman, 1975), wo ssc jeweils nur in Neuronen, nicht in der Glia beschrieben wurden.

Die ssc in den Pinealozyten von *Meriones* sind nach den Befunden von Ultradünnschnitten, Gefrierbruchpräparaten und rekonstruierten flächigen Ansichten folgendermaßen charakterisiert: sie sind

- * eR-Zisternen, die sich auf etwa 20 nm der Zellmembran annähern,
- * die nicht kollabiert,
- * fakultativ fenestriert,
- * nicht mehrfach übereinandergestapelt sind,
- * Verbindung über Tubuli mit anderen eR-Anteilen haben, v.a. mit
 - Perinuklearzisterne,
 - tubulo-zisternalem Netzwerk an der Trans-Seite des Golgi-Apparates, und die
- * Koinzidenz mit verschiedenen Strukturen der Zelle,
- * häufig ein Gegenstück in der Nachbarzelle haben.

Frühere Angaben zu ssc der Pinealozyten sind bestätigt und in mehreren Punkten ergänzt worden. Eine vergleichende Betrachtung mit ssc anderer Zelltypen zeigt, daß die ssc der Pinealozyten eher als einfacher (Grund- ?) Typ zu betrachten sind, dem zahlreiche spezialisierte (abgeleitete ?) Typen gegenüberstehen.

Ssc - Anteile des eR.

Anders als von Siegesmund (1968) für Cortexneurone angenommen und von Raviola & Raviola (1969) für amakrine Zellen der Retina berichtet, sind die ssc der Pinealozyten nur ein besonderer Teil des eR, keine davon abgelöste Struktur.

Wo immer sich eR-Kompartimente an das Plasmalemm annähern, wird der typische Abstand von 15-20 nm nicht unterschritten, das scheint der geringstmögliche Abstand zweier Membranen zu sein,

wenn es nicht zur Fusion kommt (Rambourg et al., 1979).

Ssc von Pinealozyten haben ein Lumen.

Schon Rosenbluth (1962) erwähnt, daß ssc von Neuronen in der Mitte kollabieren können, wodurch gleichzeitig die Randpartien eine blasige Aufweitung erfahren (Le Beux, 1972; Hannah & Nathaniel, 1978; Voss et al., 1980; Furuse et al., 1982; Armengol et al., 1983). Kollabierte ssc wurden als fester Bestandteil postsynaptischer Strukturen gefunden (Cortex: Siegesmund, 1968; Špaček, 1982; Špaček & Liebermann, 1982. Rückenmark: McLaughlin, 1972. Autonome Ganglien: Voss et al., 1980; Watanabe, 1983. Seitenlinienorgan: Hama, 1965). Ohne streng subsynaptische Lokalisierung liegen kollabierte ssc auch in weiteren Neuronen und Sinneszellen (Cortex: Reyners et al., 1977. Hypothalamus: Hervás & Lafarga, 1979. Haarzellen des Innenohres: Saito, 1983). Derartige kollabierte ssc fehlen in den Pinealozyten von Meriones; auch andere Autoren beschreiben im Pinealorgan nur ssc mit konstant erhaltenem Lumen (Anderson, 1965; Welsh et al., 1978 und 1979a; Heinzeller & Schinko, 1979; Karasek et al., 1982; Samarasinghe et al., 1983).

Fensterung.

Die 3D-Rekonstruktion der ssc der Pinealozyten zeigt, was aufgrund von Anschnitten eng benachbarter Zisternen (Abb. 20) zu vermuten war, aber auf dieser Basis nicht definitiv festgestellt werden konnte, daß die Zisternen - zumindest die größeren - durchaus gefenstert sein können (Abb. 23). Andere Verhältnisse finden sich in Leberzellen: die ssc sind große, richtiggehend durchlöchernte Platten, an denen die multiple Unterbrechung schon im Flachschnitt erkennbar wird (Tandler & Hoppel, 1974).

Zisternenstapel.

In zahlreichen Nerven- und Sinneszellen treten ssc in Stapeln von bis zu 12 Lagen auf (Raviola & Raviola, 1969; Furuse et al., 1982; Suarez et al., 1983; Saito, 1983). Diese Zisternen können miteinander anastomosieren (Brownell & Kachar, 1986), die äußerste Zisterne ist zumeist kollabiert (Siegesmund, 1968; Reyners et

al., 1977). Solche Stapel sollen starre Stützstrukturen darstellen (Raphael & Wróblewski, 1986; Brownell & Kachar, 1986). Derartige Zisternenstapel treten im Pineale von *Meriones* nicht auf und wurden bislang auch vom Pineale keiner anderen Spezies berichtet.

Tubuläre Verbindungen zum eR.

Ssc sind mit tieferen Anteilen des eR über Tubuli verbunden (Abb. 25). Einblick in das Ausmaß solcher tubulären Verbindungen kann nur die 3D-Darstellung geben, da die Tubuli auf Schnittbildern nur über ganz kurze Strecken (mit seltenen Ausnahmen, Abb. 19) verfolgt werden können. Wieweit die Tubuli und Zisternen verschiedener eR-Kompartimente miteinander in offener Verbindung stehen und als kontinuierliches Kanalsystem die gesamte Zelle durchsetzen, wurde an Epithelzellen in Kultur demonstriert (Terasaki et al., 1986). Die (meist ribosomenbesetzten) Tubuli, die in die Peripherie ziehen, weisen im Pinealozyten auch an den Übergangsstellen in die ssc ein unverändertes Lumen auf. Dagegen soll diese Tubulus-Übergangsstelle bei amakrinen Zellen aus der Retina bis auf einen feinfädigen Rest eingeschnürt sein (Fisher & Goldman, 1975). Auch in Pflanzenzellen wurden vergleichbare Einschnürungen beschrieben, und zwar bei der Verbindung der Perinuklearzisterne mit eR-Tubuli (Craig & Staehlin, 1988).

Verbindung zur Perinuklearzisterne.

Die offene Verbindung von ssc zur Perinuklearzisterne wird in den Pinealozyten besonders deutlich (Abb. 36 a). Solch eine Verbindung wurde mehrfach vermutet (Siegesmund, 1969; Le Beux, 1972; Suarez et al., 1983) und in Neuronen der Substantia gelatinosa (Hannah & Nathaniel, 1978) bzw. des Hypothalamus (Hervás & Lafarga, 1979) demonstriert. Völlig unbekannt war bislang, daß die Perinuklearzisterne selbst zur ssc werden kann (Abb. 16); Kernporen wurden in diesem Abschnitt der Zisterne nicht beobachtet.

Verbindung zum trans-tubulo-zisternalen Netzwerk.

Ein Teil der an ssc angeschlossenen eR-Tubuli erreicht das Grenzgebiet des Golgi-Apparates (Abb. 25) an dessen Trans-Seite

(Pavelka, 1987). In diesem Bereich, in dem Golgi-Produkte in Vesikeln abgegeben werden, liegt das "trans-tubulo-zisternale" Netzwerk (Rambourg et al., 1979; Rambourg & Clermont, 1986), das sowohl unmittelbar dem Golgi-Apparat anliegende Vesikel, als auch Zisternen und Tubuli des eR beinhaltet. Dieses Netzwerk wurde teils als eigenes Organell beschrieben ("GERL-Komplex" bei Novikoff, 1976, oder KrstiĆ, 1986 b), teils wurde es als ein allmählicher Übergang zwischen den beiden Organellen betrachtet und deshalb auch "boulevard périphérique" genannt (Morré & Ovtrecht, 1981). Tatsächlich ist eine Zuordnung der einzelnen Elemente zu eR oder Golgi-Apparat ohne enzymhistochemische Methoden nicht möglich (Roth et al., 1985). Die häufig gestellte Frage nach einer Membrankontinuität von eR und Golgi-Zisternen (z. B. Novikoff & Novikoff, 1977) konnte mit dem vorliegenden Material nicht entschieden werden; immerhin wurde eine Kontinuität von ssc, tubulärem eR und Vesikeln gezeigt, die direkt an die Golgi-Zisternen anschließen (Abb. 26 b). Ein entsprechender Übergang von rauhem eR zur Cis-Seite des Golgi-Apparates wurde in Pinealozyten beschrieben (Collin, 1982).

Für einen funktionellen Zusammenhang von ssc und eR mit Golgi-Zisternen spricht der beobachtete Gradient in der Konzentration von fällbarem Kalzium, der zur Trans-Seite hin ansteigt. Kalzium-Niederschläge in Golgi-Elementen wurden auch in Pinealozyten des Pavians gefunden (Theron et al., 1988), wenn auch ohne Hinweis auf lokale Mengenunterschiede.

Beziehung zu Mitochondrien.

In den Pinealozyten wurden ssc nicht in auffälligem Kontakt zu Mitochondrien gefunden, was in anderen Zellen eine häufige, bzw. sogar obligate Erscheinung ist (Epithelzellen des Plexus choroideus: Möllgard & Saunders, 1977; Purkinjezellen: Herndon, 1963; Takahashi & Wood, 1970).

Beziehung zu Mikrotubuli.

Mikrotubuli werden in sämtlichen Abschnitten des Pinealozyten, gehäuft in -Ausläufern gefunden; sie treten auch in unmittelbarer Nähe von ssc auf (Abb. 17 und 19; Collin, 1982). Dieselbe Beob-

achtung konnte auch bei ssc in Sinneszellen der Cochlea gemacht werden (Lubitz, 1981; Raphael & Wróblewsky, 1986).

Koinzidenz mit Strukturen an und nahe der Zelloberfläche.

Partikelanordnungen in Membranen:

Verschiedentlich wurde in Gefrierbruchpräparaten von einem Besatz der Zellmembran mit Partikeln in dem Bereich berichtet, den eine ssc unterlagert, z.B. in den Haarzellen des Innenohres (Gulley & Reese, 1977) oder bei Komplexen aus ssc und mechanischen Zellkontakten (Henkart et al., 1976; Voss et al., 1980). Die Membranen der ssc selbst zeigten dort ebenfalls große Intramembranpartikel in spezifischer Anordnung. In den Pinealozyten konnte auf den Gefrierbruchpräparaten weder in den Plasma- noch in den Zisternenmembranen ähnliche Partikelanordnungen entdeckt werden; dasselbe berichtet Krstić (1974) von Untersuchungen am Pinealorgan der Ratte.

Spaltraum zwischen ssc und Zellmembran:

In diesem 20 nm breiten Spalt finden sich in Pinealozyten keinerlei auffällige Strukturen. Bei manchen anderen Zelltypen hingegen liegt dort elektronendichtes, granuläres Material, das während der Entwicklung (Armengol et al., 1983) oder in manchen Neuronen auch im ausdifferenzierten Zustand vorhanden ist (Rosenbluth, 1962; Siegesmund, 1968; Raviola & Raviola, 1969; Takahashi & Wood, 1970; Furuse et al., 1982; Kolde & Themann, 1982). In wieder anderen Zelltypen überbrücken Filamente den Spaltraum zwischen äußerer ssc-Membran und Plasmalemm (Neurone der Substantia nigra: Le Beux, 1972. Haarzellen des Innenohres: Saito, 1983; Raphael & Wróblewsky, 1986. Sympathikus-Ganglien: Watanabe & Burnstock, 1978. Sertoli-Zellen: Baccetti et al., 1983. Skelettmuskelfasern: Franke, 1971). Auffällig häufig treten granuläres Material oder Filamente zusammen mit kollabierten ssc auf.

Ssc-Lumen:

In Pinealozyten erschien keine auffällige Kondensation von elektronendichtem Material im Zisternenlumen selbst, im Gegensatz zum Lumen von ssc in einer Kulturlinie von Tumorzellen (KB, Kumegawa et al., 1968).

Beziehung zu Synapsen:

Die ssc im Pineale zeigen keine Beziehung zu synaptischen Komplexen, die in diesem Organ ohnehin höchst selten sind (Huang & Lin, 1984).

Beziehung zu "gap junctions":

Eng benachbart finden sich ssc und "gap junctions" in verschiedenen Drüsenzellen (Speicheldrüse und Leber: Tandler & Hoppel, 1974). In einem Fall wird unterschiedliche ssc-Ausprägung entsprechend dem Stoffwechselzustand beschrieben (Schilddrüse: Nunez, 1971). In der Entwicklung scheint die ausdifferenzierte "gap junction" die Bildung von ssc auszulösen (Leber: Perissel et al., 1973). Eine entsprechende Feststellung konnte im vorliegenden Untersuchungsgut ebenso wenig wie bei Pyramidenzellen (Fiori & Mugnani, 1981) getroffen werden.

Beziehung zu "tight junctions":

Zwischen Sertolizellen wurde ein auffälliger Komplex aus "tight junctions" und ssc beschrieben (Baccetti et al., 1983). Im Pineale sind keine "tight junctions" bekannt.

Beziehung zu mechanischen Zellkontakten:

Zwischen Pinealozyten wurden Kontaktstellen beobachtet, die alle Kriterien von Adhäsionskontakten erfüllen (Abb. 17) und bevorzugt in der Nähe großer ssc liegen (Abb. 23 d). Allerdings spart die eR-Zisterne häufig die unmittelbare Kontaktstelle aus. Diese Beobachtung wurde auch in anderen Zellformen gemacht (Leberzellen: Tandler & Hoppel, 1974; Møller et al., 1983. Haarzellen des Innenohres: Saito, 1983). Möglicherweise besteht eine wechselseitige Beeinflussung von Adhäsionskontakten und ssc, eine Vorstellung, die ähnlich von van Peteghem & Mareel, 1978 formuliert wurde. Diese Autoren beobachteten in HeLa-Zellen eine strenge zeitliche Koinzidenz bei der Bildung von Zellkontakten und dem Auftreten von ssc.

Denkbar ist, daß größere ssc die Ausbildung von Adhäsionskontakten, oder umgekehrt diese die Ausbildung von ssc induzieren. Im zweiten Fall würde auch die Häufigkeit großer zweiseitiger ssc dadurch erklärbar, daß ein Zellkontakt in beiden Zellen die ssc-Bildung hervorrufen oder begünstigen könnte.

Zweiseitige ssc.

Im Pineale ist mit Hilfe der 3D-Rekonstruktion deutlich geworden, daß die kleinen Endknöpfchen der eR-Tubuli nur selten auf ein Pendant in der Nachbarzelle treffen und daß die Bildung zweiseitiger ssc eine Eigenschaft vor allem der großflächigen ssc ist (Abb. 23). Im Schnittbild wird die Häufigkeit von zweiseitigen ssc nicht in vollem Umfang erkannt, weil Anschnitte außerhalb des Überlappungsbereiches wie einseitige ssc aussehen. Trotzdem muß festgehalten werden, daß auch einseitige (großflächige) ssc in benachbarten Pinealozyten existieren.

Zweiseitige ssc sind in verschiedenen Zelltypen beschrieben worden, z.B. in Drüsenzellen der Parotis (Kolde & Themann, 1982) und in Ameloblasten (McKee & Warshawsky, 1984). Bei den oben erwähnten Komplexen von "tight junctions" und ssc in Sertoli-Zellen treten ssc immer zweiseitig auf.

Zweiseitige ssc könnten ein rein zufälliges Ereignis sein; in Ameloblasten liegen ssc in solcher Dichte vor, daß der Anteil zweiseitiger ssc den aufgrund der Treffertheorie gestellten Erwartungen entspricht (McKee & Warshawsky, 1984). Das kann in Pinealozyten nicht gelten: wo nur rund 6% der Zelloberfläche von ssc unterlagert sind, kann der Umstand, daß 14 von 16 großen ssc eines Rekonstruktionsgebietes (Abb. 23) mit einer ssc der Nachbarzelle überlappen, kaum als Zufall erklärt werden. Möglicherweise üben Substanzen und/oder Strukturen der Zellmembran und /oder des Interstitiums eine Attraktion auf das eR aus, sodaß es an bestimmten Stellen zur Ausbildung von ssc von beiden Seiten kommt. Solche Überlegungen wurden schon von Weis (1968) angestellt. Eine Induktionswirkung, die vom Typ der Nachbarzelle abhängt, wurde verschiedentlich erörtert (Cortexneurone: Reyners et al., 1977; Haarzellen des Innenohres: Brownell & Kachar, 1986; Raphael & Wróblewski, 1986), scheidet im Pinealorgan aber aus, da ssc gegenüber Gliozyten und Axonen in gleichem Maße gebildet werden, wie gegenüber Pinealozyten (vgl. 3.1).

4.2 Inkonzanz der ssc der Pinealozyten

Schon Rosenbluth (1962) und verschiedene andere Autoren (z.B. Le Beux, 1972) vermuteten, daß ssc keine dauerhaften, sondern temporäre Erscheinungen sind. Das kann wohl nicht allgemein, sondern für verschiedene ssc-Typen in jeweils ganz unterschiedlichem Ausmaß gelten. Verschiedene Hinweise aus der Morphologie und den Auswirkungen externer Einflüsse auf die ssc im Pineale lassen auf einen ständigen Umbau der Zisternen schließen.

Morphologische Hinweise.

Morphologische Äquivalente stabilisierender Strukturen fehlen den ssc der Pinealozyten von *Meriones* völlig. Als relativ stabil könnten Zisternen betrachtet werden, die zu einer pentalaminaren Struktur kollabiert, deren Membranen also im mittleren Zisternenbereich miteinander verschmolzen sind, oder ssc, die ortsfest und in mehreren Lagen auftreten, oder solche, deren äußere Membran mit Filamenten an das Plasmalemm fixiert ist. Solche ssc sind vermutlich in ihrer Fähigkeit zum schnellen Umbau eingeschränkt. Ferner zeigt die Größenmessung an ssc des rekonstruierten Pinealozytensektors, daß - wenngleich mit fließendem Übergang - neben großen ("eentlichen") ssc zahlreiche Tubulusendigungen des eR kleinflächig an das Plasmalemm herantreten: das weist auf die Möglichkeit hin, daß aus kleinen eR-Endfüßchen durch Erweiterung und/oder Fusion großflächige ssc hervorgehen (mit mehreren zuführenden Tubuli), und daß umgekehrt große ssc sich wieder zu kleinen Tubulusenden zusammenziehen könnten.

Veränderung pinealer ssc unter externen Einflüssen.

Der Einfluß der Tageszeit macht sich bei der Population kleiner einseitiger ssc zwar kaum bemerkbar, umso stärker hingegen in der der großen zweiseitigen ssc (Abb. 29). Unterbrechung der Innervation durch den Sympathikus reduziert den Besatz der Pinealozytenmembran mit ssc sehr deutlich (Abb. 30). Schon diese Befunde zeigen schlüssig, daß die untersuchten ssc nur Momentaufnahmen aus einem dynamischen Prozeß sein können; die Zelle muß also im Stande sein, ssc aufzubauen und wieder einzuschmelzen.

4.3 Hypothese zum Auf- und Abbau pinealer ssc

Motilität des eR.

Beobachtungen an lebenden Zellen zeigen, daß das gesamte eR als metastabile Membrankonfiguration zu sehr schnellen morphologischen Veränderungen fähig ist (Lee and Chen, 1988).

Mikrotubuli, die bekanntlich eine wichtige Rolle bei der Bewegung von Cilien und Geißeln, sowie der Chromosomen im Spindelapparat spielen, sind auch an der Bewegung von anderen Organellen in tierischen Zellen beteiligt (Übersicht bei Schliwa, 1984; Allen et al., 1985). Nach lichtmikroskopischen Beobachtungen scheinen Mikrotubuli auch für die Motilität des eR, bzw. eR-ähnlichen in vitro-Systemen (Lee & Chen, 1988; Dabora & Sheetz, 1988), sowie für den Erhalt der Konfiguration des komplexen Raumnetzes nötig zu sein: nach experimenteller Depolymerisation der Mikrotubuli in Kulturzellen ziehen sich große Teile des eR aus der Zellperipherie zurück, nach einer Wiederherstellung der Mikrotubuli wandert das eR wieder in die Peripherie aus (Terasaki et al., 1986). Mikrotubuli werden auch für den Erhalt der Golgi-Zisternen verantwortlich gemacht (Pavelka, 1987), die nicht nur in ihrer Konfiguration an ssc erinnern (fenestrierte, flache Zisternen), sondern in Pinealozyten ebenfalls eine diurnale Größenänderung aufweisen, wobei sich die Expansionsgipfel von Golgi-Zisternen (Dombrowsky & McNulty, 1984) und ssc (Heinzeller & Tutter, 1987) weitgehend decken.

Modellvorstellung zur ssc-Bildung.

Ähnlich wie in vitro vorgegebene Membranstücke unter dem Einfluß von Mikrotubuli und mit ihnen assoziierten Proteinen zu mehrfach quervernetzten Membransystemen anwachsen (Vale & Hotani, 1988), kann man sich den Auf- und Abbau von ssc vorstellen:

Bei einer Erweiterung des eR könnten tubuläre eR-Elemente durch Interaktionen mit Mikrotubuli in die Zell-Peripherie wandern und sich unter der Plasmamembran zu Zisternen ausbreiten; mehrere solche stempelförmigen Gebilde könnten anschließend, ohne den Kontakt zum Gesamtnetzwerk je zu verlieren, zu großen Lakunen verschmelzen.

Entgegen dem Bestreben des eR, sich nach zentral zusammenzuziehen (s.o.), könnten Wechselwirkungen zwischen Mikrotubuli und eR den expandierten Zustand und damit die Konfiguration der ssc erhalten. Dabei ist an Wechselwirkungen der Art zu denken, die auch Transportvorgänge entlang Mikrotubuli bewirken.

Eine Größenabnahme der ssc könnte durch den Rückzug von einzelnen, tubulären eR-Elementen, die keine Verbindung mehr zu Mikrotubuli haben, von der Zelloberfläche erfolgen. Das Ausmaß der Ausdehnung von eR-Anteilen in der Peripherie und dementsprechend von ssc könnte also direkt vom Ausbildungsgrad des Mikrotubulus-Gerüsts und von den für den Transport benötigten Proteinen abhängen.

Mikrotubuli werden auch deshalb für eine entscheidende Rolle beim ssc-Umbau favorisiert, weil sie tagsüber in größerer Dichte als nachts gefunden werden (Welsh et al., 1979 a), also parallel zum Tagesgang der ssc. Schließlich läßt sich in die Vorstellung von ssc-Umbau durch Mikrotubuli auch integrieren, daß diese vermutlich durch Melatonin und freies Kalzium beeinflusst werden.

Einfluß von Melatonin auf Mikrotubuli.

Die zytologische Wirkung von Melatonin wurde sowohl im Hinblick auf Transportfunktionen der Mikrotubuli, als auch auf deren Längenveränderung durch Polymerisation und Depolymerisation von Tubulin-Untereinheiten geprüft.

In Hirnhomogenaten (Poffenbarger & Fuller, 1976) bleibt Melatonin ohne Effekt auf die Polymerisation von Tubulin, ebenso in Präparationen von aus gereinigtem Tubulin repolymerisierten Mikrotubuli (eigene unveröffentlichte Beobachtungen in Zusammenarbeit mit Labor Dr. D.G. Weiss/TU München). Dagegen zeigen Experimente in vivo deutliche Effekte nach Melatoningabe: in peripheren Nerven hemmt Melatonin die Polymerisation von Tubulin (Piezzi & Cavicchia, 1981) und behindert den schnellen axonalen Transport (Prevedello et al., 1979). Nach Freire & Cardinali (1975) sinkt der Gehalt an Tubulin im Hypothalamus nach Melatoningabe, gleichzeitig steigt er im Pineale; letzteres kann als Effekt einer negativen Rückkopplung verstanden werden, die die Melatoninsyn-

these im Pineale unterdrückt (Grota et al., 1980; Hong & Stetson, 1987).

Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß eine hemmende Wirkung von Melatonin auf die Mikrotubuli-Ausbildung oder -Transportfähigkeit bestehen könnte (Cardinali, 1980). Eine erhöhte Melatoninkonzentration in den Pinealozyten könnte also von einer Reduktion der ssc gefolgt werden.

Einfluß von Kalzium auf Mikrotubuli.

Eine erhöhte Kalziumkonzentration in Axonen bewirkt einen umgehenden Zerfall von Mikrotubuli (Übersicht bei Schlaepfer & Zimmerman, 1984). Auf der Basis von in vitro Versuchen wurde vermutet, daß physiologische Veränderungen der intrazellulären Kalziumionenkonzentration die Balance zwischen Mikrotubuli und Tubulin-Dimeren modulieren könnten (Übersicht bei Dustin, 1984). Solch ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann durch Freisetzung aus den intrazellulären Speichern erfolgen, wie sie als Reaktion auf die Aktivierung der Zelle auftritt (Rasmussen, 1984). Die ssc sind nach den vorliegenden Ergebnissen solche Ca^{2+} -konzentrierenden Speicher (s.u.) in der Zellperipherie. Denkbar ist, daß die Öffnung dieser Speicher mit einer Abnahme an polymerem Tubulin und/oder mit einer Einschränkung der Wechselwirkungen zwischen eR und Mikrotubuli verbunden ist, als deren Folge ssc reduziert werden.

Es könnte also sowohl die Erhöhung des Melatonin- als auch des Kalziumspiegels im Pinealozyten für eine Verringerung der ssc verantwortlich sein, wie sie ja auch in der nächtlich aktiven Zelle beobachtet wird.

Einwände gegen das ssc-Mikrotubuli-Modell.

Unter den möglichen Einwänden gegen das vorgeschlagene Modell sollen einige kurz erörtert werden:

Mikrotubuli unterliegen einem permanenten Auf- und Abbau ("dynamische Instabilität", Mitchison & Kirschner, 1984). Diese Eigenschaft spricht scheinbar gegen ihren Beitrag zur Stabilisierung der ssc, in Wirklichkeit begünstigt sie die Dynamik des ssc-Umbaues.

Bei der Wertung von Interaktionen zwischen Mikrotubuli und Organellen muß die Existenz mehrerer Mikrotubuli-Populationen beachtet werden (z.B. Miller et al., 1987; Bulinski et al., 1988). Diese Subpopulationen könnten sich auch in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Kalziumionen- und/oder Melatoninkonzentrationen unterscheiden.

Kontakte zwischen ssc und Mikrotubuli konnten im Ultradünnschnitt nicht dargestellt werden. Bei in vitro Versuchen wurde aber gezeigt, daß wenige Berührungspunkte für die Translokation von vernetzten Membrangebilden ausreichen können (Dabora & Sheetz, 1988).

Unabhängig von Mikrotubuli wären auch andere Vorstellungen für den Auf- und Abbau der ssc denkbar:

Die Zisternen könnten im Zusammenhang mit der Akkumulation von Kalziumionen (s.u.), bzw. der höchstwahrscheinlich damit verbundenen Zunahme an Ca^{2+} -bindenden Proteinen in diesen eR-Bereichen vergrößert werden, möglicherweise sogar nach Art einer Quellung. Immerhin werden nach pharmakologischer Blockade der Kalziumausschüttung gequollene ssc gefunden (Abb. 41); allerdings wären zusätzliche Mechanismen nötig, um zu erklären, daß der ssc-Durchmesser unter physiologischen Bedingungen völlig invariabel ist.

Für die Stabilisierung der ssc-Ausbildung unter der Plasmamembran könnte auch das dort vorhandene Aktinnetz verantwortlich sein, das ebenfalls von Kalziumionen abhängig ist (Malaïsse, 1988). Hierbei bliebe aber die Frage nach dem Motor der erforderlichen Wanderung von eR-Anteilen in die Peripherie offen, da in tierischen Zellen Aktin mit dem Organellentransport nicht in Verbindung steht (Übersicht bei Schliwa, 1984).

4.4 Mögliche Funktionen der ssc

Allgemein läßt die Lage der ssc auch in ihrer Funktion einen Bezug zur Zellperipherie, bzw. zur Zellumgebung vermuten. Die morphologische Variabilität der ssc in verschiedenen Zelltypen weist auf Unterschiede auch in ihrer funktionellen Bedeutung hin; das Spektrum reicht von rein mechanischer Stützfunktion über Sekretausschleusung bis hin zur interzellulären Kommunikation. Im Fall der ssc von Pinealozyten erscheinen aufgrund von eigenen Befunden und Literaturangaben insbesondere folgende Punkte von funktioneller Bedeutung zu sein:

- * Aufnahme, Speicherung und Freisetzung von Kalzium;
- * mögliche Mitwirkung der ssc an der Rezeptor-gesteurten Stimulation von Pinealozyten;
- * mögliche Beteiligung der ssc an der inkretorischen Zellantwort.

Ssc als Kalziumspeicher

In den Pinealozyten wurde die Funktion des eR und speziell seiner ssc als Kalziumspeicher mit zwei Nachweisverfahren, die verschiedenen Fragestellungen gerecht werden, demonstriert. Die Prüfung einer Ca^{2+} -Aufnahme erfolgt mit Oxalatfällung, der lokalisierende Nachweis mit der Antimonatfällung.

Kritik der Nachweismethoden.

Oxalat: Bei der ATP-abhängigen Fällung mit Oxalat wird die Fähigkeit der ssc, Kalzium aus ihrer Umgebung unter Energieverbrauch anzureichern, sich also aktiv am Kalziumionen-Haushalt des Pinealozyten zu beteiligen, demonstriert (Abb. 33). Bei der für diese Methode erforderlichen Kalzium-Überflutung beschränkt sich die Kalziaufnahme in den Pinealozyten nicht auf eR-Anteile. Mitochondrien, die ebenfalls als Speicherorganellen für intrazelluläres Kalzium gelten, beginnen erst bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen zu sequestrieren (Übersicht bei Blaustein, 1988); sie zeigten in diesen Präparaten ebenfalls Niederschläge (Abb. 33). Allgemein gilt Kalzium-Akkumulation in Mitochondrien als Indikator für einen unphysiologischen Zustand (McGraw et al., 1980).

PPA: Bei der morphologischen Demonstration von Kalzium mit Hilfe von Antimonat-Niederschlägen, die ohne Kalziumangebot von außen, also unter (quasi) physiologischen Bedingungen, erfolgt, sind nur in den eR-Anteilen und den damit verbundenen ssc Niederschläge vorhanden. Dieses histochemische Nachweisverfahren für Kalzium gilt aber als launisch und erfordert eine kritische Beurteilung der erhaltenen Niederschläge. Die Kontrollversuche mit EGTA-Komplexierung (Abb. 12) und Elementanalyse (Abb. 11) schließen eine Darstellung von Magnesiumionen weitgehend aus. Es kann also davon ausgegangen werden, daß die Niederschläge durch Kalziumionen verursacht wurden, die vermutlich lose (Wick & Hepler, 1982) an Proteine gebunden waren. Mit der angewandten Modifikation der PPA-Methode bleibt auch zum einen die Ultrastruktur ziemlich intakt, zum anderen sind die Präzipitate für eine exakte Angabe der Lokalisation feinkörnig genug.

Verteilungsmuster des Kalziumantimonates.

Extrazellulärer Raum: Durch die Perfusion als ersten Präparationsschritt wurde wohl der Interzellularraum freigespült, sodaß trotz der natürlicherweise dort sehr hohen Kalziumionenkonzentration (Campbell, 1983) keine Niederschläge auftraten. Eine Ausnahme bildet die unmittelbare Umgebung von Acervuli (Abb. 34), wo wahrscheinlich Kalzium in besonders hohen Konzentrationen und/oder schwerlöslicher Bindung vorliegt.

Intrazellulär: In den Mitochondrien treten mit der modifizierten PPA-Methode, im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (KrstiĆ, 1985; Welsh, 1984; Pizarro et al., 1988; Theron et al., 1988) keine Niederschläge auf. Man kann also davon ausgehen, daß die mit der modifizierten PPA-Methode erhaltenen Verteilungsmuster der Niederschläge weitgehend die physiologische Situation im Kalziumhaushalt widerspiegeln. Beim eR und seinen ssc haften die Niederschläge nicht nur an den Membranen, sondern können auch eindeutig dem Lumen zugeordnet werden (Abb. 36). Nicht nur in ssc/eR der Pinealozyten, sondern auch im eR der Gliazellen, wenngleich in wesentlich geringeren Mengen, läßt sich Kalzium darstellen.

Kalziumabgabe.

Durch die Untersuchung von Pinealorganen in der Dunkelfase wurde erkennbar, daß die Kalziumspeicher ssc/eR in dieser Aktivitätsphase der Pinealozyten offensichtlich geleert sind (Abb. 39). Die Annahme, daß tatsächlich nachts eine Abgabe des gespeicherten Kalzium an das Zytosol erfolgt, wurde pharmakologisch gesichert: Dantrolen, das im Muskel die bei Erregung stattfindende Ca^{2+} -Abgabe aus dem sarkoplasmatischen Retikulum blockiert (Helland et al., 1988), wurde den Tieren noch in der Hellphase verabreicht. Die eR-Anteile in den Pinealozyten dieser Tiere bleiben auch in den nächtlich stimulierten Zellen gefüllt (Abb. 41). Dieser Befund läßt darauf schließen, daß die intrazelluläre Ca^{2+} -Verteilung physiologische Prozesse widerspiegelt, sie kann also im Kontext mit Leistungen der Zelle diskutiert werden.

Möglicher Beitrag der ssc zur Stimulation der Pinealozyten

Ganz allgemein treffen externe Signale in Form von Transmittern (oder Hormonen o.ä.) auf spezifische Rezeptoren der Zellmembran (des Zytosols, des Zellkerns), binden dort und setzen dadurch intrazelluläre Messenger in Gang, die ihrerseits die spezifische Zellantwort initiieren. Häufig sind Kalziumionen an der Aktivierung von "second messengers" beteiligt und dienen selbst auch häufig als solche. Pinealozyten besitzen in ihrer Zellmembran α - und β -Rezeptoren, die die noradrenerge Zellaktivierung vermitteln (Ho et al., 1987), darüberhinaus zahlreiche Bindungsstellen für Hormone (Cardinali, 1984), auch für ihr eigenes Hormon Melatonin (Grota et al., 1980; Vacas & Cardinali, 1980).

In Neuronen folgt auf einen Membranstimulus hin ein rascher, aber geringer Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, freigesetzt aus dem eR, der seinerseits Ca^{2+} -abhängige Enzymsysteme z.B. Proteinkinasen aktiviert (Blaustein, 1988). Auch im Pinealozyten ist durch Besetzung der adrenergen Rezeptoren eine intrazelluläre Kalzium-Mobilisierung auszulösen, die membranständige Phospholipasen und Proteinkinasen aktiviert (Ho et al., 1988). Das mobilisierte Kalzium stammt höchstwahrscheinlich aus dem eR, wobei Putney (1986) in einem Modell eR-Anteile postuliert, die

der Plasmamembran eng assoziiert sind und aktiv Kalzium aufnehmen - wie sie mit den ssc verwirklicht sind. Den ssc kommt demnach eine Schlüsselrolle in der Regulierung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration zu: sie könnten sowohl Trigger-Kalzium bereitstellen, als auch mittelbar Kalziumkanäle im Plasmalemm öffnen, das in die Zelle einströmende Kalzium auffangen und für weitere Aktivierung zellinterner Messenger bereitstellen, bzw. nach erfolgter Zellantwort zur Wiederauffüllung der Speicher verwenden, wodurch mittelbar die Kalziumkanäle wieder geschlossen würden. Auf diese Weise könnten die ssc den Zustrom von Kalziumionen aus dem Interstitium kontrollieren, auf die Weitergabe an das Zytosol modulierend wirken und damit über die Ca^{2+} -abhängigen Messengersysteme auf die Bereitschaft der Zelle, einen Stimulus zu beantworten, maßgeblich einwirken.

Ssc und Sekretion.

Pinealozyten bilden verschiedene Indole als Inkrete, vor allem Melatonin. Für eine direkte Beziehung der ssc zum Metabolismus oder zur Freisetzung dieser (ohnein membrangängigen) Indole fehlt jeder Hinweis. Peptid- und Proteinfractionen mit noch unbekannten Komponenten wurden aus Pinealorganen dargestellt (Juillard & Collin, 1980; Pévet, 1982; Rodriguez et al., 1988), deren biologische Wirksamkeit - zumeist auf Organe des Genitaltraktes bzw. auf das hypothalamisch-hypophysäre System - dafür spricht, daß hier weitere Hormone des Pinealorganes vorliegen. Wiederum spielt allgemein die Konzentration von Kalziumionen, an deren Regulation die ssc einen wesentlichen Anteil haben könnten, eine Trigger-Funktion bei der Freisetzung von Hormonen (Übersicht bei Malaisse, 1988).

Für eine direkte Mitwirkung der ssc an der Synthese von Proteinen und Glykoproteinen (z.B. Ca^{2+} -bindende Proteine, Rezeptorproteine) sind strukturelle Hinweise gegeben: Ribosomenbesatz und enge Beziehung zu den Golgi-Zisternen.

Da Exozytosefiguren so selten beobachtet werden, könnte auch an eine Mitwirkung der ssc an der Freisetzung von Peptiden/Proteinen gedacht werden. Allerdings konnte niemals eine Fusion zwischen ssc und Plasmalemm beobachtet werden. Ganz darf diese Möglichkeit

jedoch nicht ausgeschlossen werden, denn bei einer Reihe von Neuronentypen wurde Acetylcholinesterase in den ssc lokalisiert (Brzin et al., 1966; Weis, 1968; Pannese et al., 1974; Watanabe, 1983). Llinas & Greenfield (1987) beobachteten, daß dieses Enzym nach lokalem Ca^{2+} -Eintritt freigesetzt wird.

4.5 Circadiane Rhythmen

Im Pinealorgan unterliegen bekanntermaßen die Enzymaktivitäten des Indolstoffwechsels, v.a. N-Acetyl-Transferase (Reiter et al., 1984), und damit die Synthese und Freisetzung von Melatonin (Goldman & Darrow, 1983) einer circadianen Rhythmik (nachts maximal). Dabei handelt es sich um endogene Rhythmen, die - wie schon in der Einleitung geschildert - über die sympathische Innervation durch retinale Impulse an dem Tagesgang gekoppelt werden. Diese circadiane Aktivität spiegelt sich bei verschiedenen Spezies in Organellenhäufigkeiten der Pinealozyten wider: "synaptic ribbons" werden vermehrt nachts gefunden (Vollrath, 1973; Kurumado & Mori, 1977; Matsushima et al., 1983; Soriano et al., 1984; Khaledpour & Vollrath, 1987), "dense core vesicles" treten mitten in der Hellphase in maximaler Anzahl auf (Rominj et al., 1976; Karasek et al., 1982); diese beiden Strukturen kommen in Pinealozyten von Meriones eher selten vor.

Die ssc zeigen eine diurnale Tagesrhythmik ("diurnal" statt "circadian", da sie noch nicht ohne Synchronisation untersucht wurde). Die Amplitude der diurnalen Größenschwankung ist nicht unbedeutend, sie beträgt für ein- und zweiseitige ssc 23%, bei den zweiseitigen ssc 26% des Tagesminimums. Außerdem werden die maximalen Werte nachmittags gemessen, zu einer Zeit, in der der Pinealozyt sein größtes Zellvolumen erreicht (Heinzeller et al., 1988 b); es müssen also nachmittags reichlich ssc gebildet werden und/oder vorhandene ssc vergrößert werden, sonst könnte nicht maximale Anschnittlänge ohne Reduktion des Gesamtbesatzes der Pinealozytenmembran auftreten (Tab. 1). Die Aussage von Welsh et al. (1979 a), die ssc wären tageszeitlich invariabel, entspricht auf Grund der stereologischen Methodik (Trefferzählung, ohne vergleichende Längenmessungen) dem vorliegenden Befund, wonach

der Gesamtbesatz der Zellmembran mit ssc sich im Laufe des Tages nicht merklich ändert. Daten anderer Autoren, das Gesamt-eR betreffend, sind widersprüchlich: nächtliche Reduktion beim Streifenhörnchen (Karasek et al., 1982), nächtliche Vermehrung beim Goldhamster (Dombrowsky & McNulty, 1984).

Der Rhythmus der ssc-Ausdehnung verläuft etwa invers zu dem bei Meriones beobachteten der Melatoninsynthese (Reiter, 1987). Das steht in Einklang mit der unter 4.3 vorgestellten Hypothese, wonach nächtlich hohe Melatoninwerte über einen Abbau von Mikrotubuli bzw. eine Störung ihrer Transportleistung einen Rückzug des eR aus der Zellperipherie herbeiführen könnten: die kleinsten ssc werden in den späten Nachtstunden gefunden. Welche Bedeutung kommt nun in diesem Zusammenhang den ssc in ihrer Eigenschaft als Kalziumspeicher zu? Die tagsüber gefüllten Speicherräume sind nachts geleert; in der Nacht stehen die Pinealozyten unter anhaltendem Sympathikus-Feuer, was entsprechend dem Modell von Putney (s.o.) auch mit einem Einstrom von externem Kalzium verbunden sein dürfte. Die gesteigerte intrazelluläre Kalziumionenkonzentration könnte wie die erhöhten Melatoninwerte für die Reduktion der ssc im Sinne der Hypothese von 4.3 verantwortlich sein. Jedenfalls sind in nerval stimulierten Pinealozyten die ssc kleiner und Kalzium-frei bzw. -arm. Tatsächlich wird eine Unterbrechung dieser nervalen Nacht-Stimulation durch Belichtung der Tiere mit einer allmählichen Ansammlung von Kalzium in ssc/eR beantwortet (Abb. 40). Daß ssc während des Tages anwachsen und Kalzium akkumulieren, korreliert mit einer gleichzeitigen Zunahme der β -Rezeptorendichte der Pinealozytenmembran zu einem abendlichen Maximum (Romero & Axelrod, 1974) und einer in vitro festgestellten Ca^{2+} -Empfindlichkeit der β -Rezeptoren (Wilkinson, 1978). Große, Kalzium-reiche ssc finden sich also in sensitiven Zellen, kleine, Kalzium-arme ssc in insensitiven Pinealozyten. Vergleichbares wird auch unter dem Einfluß von chronischem sozio-psychischem Stress beobachtet: solche Tiere weisen eine erhebliche Reduktion der ssc der Pinealozyten (Heinzeller, 1985) und eine reduzierte Stimulierbarkeit der Melatoninsynthese auf (Heinzeller et al., 1988 a).

4.6 Ssc nach Ausschaltung von stimulierenden Einflüssen

Ergänzend zum relativ schnellen Wechsel von Tag-Inhibition und Nacht-Stimulation wurden zwei langfristig wirksame Veränderungen der Pinealsteuerung und ihre Auswirkung auf die ssc untersucht, die der Rückkopplung durch gonadale Hormone und die der Innervation durch den Sympathikus. In beiden Fällen kann primär eine Beeinflussung der Melatoninsynthese erwartet werden.

Rückwirkung gonadaler Hormone

Die nächtliche Melatoninsynthese des Pinealorganes greift bei einer Vielzahl von Säugern in die Gonadensteuerung ein. Das Melatonin-Signal passt als Information über die Tageslänge die Fortpflanzungsaktivität den Jahreszeiten an, wobei nicht sicher geklärt ist, ob die Dauer der Melatoninausschüttung und/oder das Zusammenspiel von Melatoninausschüttung und rhythmischer Melatoninempfindlichkeit der Zielorgane entscheidend ist (Zusammenfassung der beiden Hypothesen bei Reiter, 1987). Bei Nagern jedenfalls wirkt sich ein langer Tag fördernd auf die Gonaden aus und unter bestimmten Bedingungen wirkt Melatonin antigonadotrop (Vaughan et al., 1976; Übersicht bei Stetson & Watson-Whitmyre, 1984). Auch von indolfreien Pinealextrakten wurde eine antigonadotrope Wirkung beschrieben (Benson et al., 1980; Pevet, 1985). Im Gegenzug greifen Produkte der Gonaden (Testosteron) stimulierend an den Pinealozyten an (Cardinali, 1984; Foldes et al., 1985; Peschke et al., 1988). Kastration schaltet also eine Stimulation der Melatoninsynthese ab, und exogene Testosterongabe kompensiert diese Wirkung, wie bei Ratten gezeigt werden konnte (Daya & Potgieter, 1985). In Pinealozyten mit reduzierter Melatoninsynthese wären vergrößerte und/oder vermehrt ssc zu erwarten, und umgekehrt eine Reduktion der Zisternen nach Entfernung der Hypophyse, Erwartungen, die bei Ratten auch bestätigt werden konnten (Karasek et al., 1978; Karasek, 1985).

Ein entsprechendes Ergebnis blieb bei den hier vorgelegten Studien aus, die ssc sind von der Kastration so wenig beeinflusst wie von substituiertem Testosteron (Abb. 31), obwohl die Wirkung

beider Eingriffe an akzessorischen Geschlechtsdrüsen und an der Markierdrüse eindeutig erkennbar ist (Abb. 6). Möglicherweise ist der Befund damit zu erklären, daß diese Tiere konstant im Langtag gehalten wurden. Diese Haltungsbedingungen gleichen denen der Fortpflanzungszeit; möglicherweise sind Pinealozyten unter diesen Bedingungen wenig sensitiv für rückkoppelnde Meldungen der Gonadensteuerung. Bei kastrierten Hamstern konnte tatsächlich unter Kurztagbedingungen eine höhere Empfindlichkeit des Pineale auf Steroide gezeigt werden als im Langtag (Turek, 1979).

Innervation durch den Sympathikus

Die für die Melatoninsynthese des Pinealorganes entscheidende Innervation ist die durch die Nervi conarii mit dem Ursprung in den oberen Cervikalganglien des sympathischen Grenzstranges; ihre Ausschaltung stört die Synthese (Reiter, 1973; Klein, 1985), ihre Stimulation läßt die elektrische und sekretorische Aktivität im Pinealorgan ansteigen (Reuss, 1986). Daneben bestehen auch zentrale Afferenzen (hypothalamisch und habenulär, Wagner, 1982; Korf & Möller, 1984; Möller, 1985), deren Axone nach Exstirpation des Ganglion cervicale superius selbstverständlich weiterhin im Pineale gefunden werden (Lin et al., 1975; Karasek et al., 1983). Ebenso bleibt das Pineale hormonal ansprechbar (Cardinali, 1984; Gonzales-Brito et al., 1988). Dennoch ist die Ganglionektomie zweifellos ein massiver Eingriff, der bei den Pinealozyten, wenn schon nicht zu Zelluntergängen, so doch zu erheblichen zytologischen Veränderungen führt.

Die als Spuren der Pineal-Aktivität gedeuteten Kalkkonkretionen nehmen nach Ganglionektomie deutlich ab (Reiter et al., 1973); ebenso nach der Implantation von Melatonindepots, die die endogene Melatoninsynthese unterdrücken (Champney et al., 1985). Die Anzahl der "synaptic ribbons" fällt drastisch, klettert aber bald auf höhere Werte (kompensatorische Reaktion?) als normal (King & Dougherty, 1982). Für Synthese- und Sekretionsleistungen zuständige Organellen sind in Ausdehnung bzw. Zahl reduziert: Nucleoli, Golgi-Apparat, gesamtes eR und "dense core vesicle" (Rominj, 1975; Welsh et al., 1979 b; Karasek et al., 1983).

Die ssc in der vorliegenden Untersuchung sind infolge der Ganglionektomie erheblich seltener geworden, nämlich um 34% (Abb. 29). Berücksichtigt man, daß die Pinealozyten gleichzeitig kleiner geworden sind (Heinzeller et al., 1988 b), so müssen rund 40% der ssc eingeschmolzen worden sein. Bemerkenswerterweise entspricht die durchschnittliche Länge der übriggebliebenen ssc derjenigen der Kontrolltiere. In einer Untersuchung von Welsh et al. (1979 b) wurden nach Ganglionektomie keine Veränderungen an den ssc beschrieben; das stellt jedoch insofern keinen Widerspruch zu den vorliegenden Befunden dar, als diese Autoren eine rein numerische Zählung von eR-Kontakten durchgeführt haben, ohne die Länge der Zisternen zu bewerten.

Aufgabe der ssc in den Pinealozyten von *Meriones unguiculatus*

Nach zytologischen und zytochemischen Untersuchungen wird als wesentliche Leistung der ssc in den Pinealozyten von *Meriones unguiculatus* ein Beitrag zur Rezeptor-vermittelten Zellstimulation postuliert. Diese Annahme wird durch die zytometrischen Befunde von unterschiedlich stimulierten bzw. inhibierten Pinealorganen gestützt.

5. Zusammenfassung

Im Pinealorgan männlicher Rennmäuse (*Meriones unguiculatus*, *Cricetidae*) sind rund 6 % der Pinealozytenmembran von "subsurface cisterns" (ssc) unterlagert. Darunter versteht man flache Zisternen des endoplasmatischen Retikulum von bislang unbekannter Funktion.

1. Anhand von Schnitt- und Gefrierbruchpräparaten, insbesondere an räumlichen Rekonstruktionen aufgrund einer ultradünnen Schnittserie werden Details der ssc beschrieben. Danach können großflächige, gelappte, teils gefensterte ssc mit mehreren zuführenden eR-Tubuli und einer engen Assoziation zum Golgi-Apparat von solchen unterschieden werden, die als einfache, blind endende eR-Tubuli nahe an das Plasmalemm herantreten und sich dort nur wenig verbreitern.

2. Es wird gezeigt, daß ssc (neben anderen Abschnitten des eR) aktiv Kalziumionen anreichern können. Das geschieht untertags, nachts sind diese Kalziumspeicher leer.

3. Die Vermessung von ssc erbringt einen deutlichen Tagesgang der ssc-Länge mit nachmittäglichem Maximum, eine erhebliche numerische Reduktion der ssc nach bilateraler Exstirpation des Ganglion cervicale superius, dagegen keine Veränderung nach Kastration der Tiere bzw. nach Testosteron-Substitution.

Die morphologische Charakteristik erlaubt, zahlreiche bei anderen Zelltypen angenommene Funktionen für die ssc der Pinealozyten auszuschließen. Ihre Hauptbedeutung dürfte in der Regelung des zytosolischen Kalziumspiegels liegen. Es werden eine Hypothese zum Auf- und Abbau der ssc sowie - eng damit verknüpft - ein Modell der Einflußnahme dieser Kalziumspeicher auf die Stimulierbarkeit der Pinealozyten entwickelt. Diese Modellvorstellung hält der Überprüfung an den morphometrischen Daten stand, die an unterschiedlich stimulierten bzw. inhibierten Pinealorganen erhoben wurden:

6. Literaturverzeichnis

- Allen, R.D., D.G. Weiss, J.A. Hayden, D.T. Brown, H. Fujiwake and M. Simpson: Gliding movement of and bidirectional transport along native microtubules from squid axoplasm: Evidence for an active roll of microtubules in cytoplasmic transport. *J. Cell Biol.* 100, 1736-1752, 1985
- Anderson, E.: The anatomy of bovine and ovine pineals. *J. Ultrastruct. Res.* 8, 1-80, 1965
- Arendt, J.: Some physiological responses and effects of the pineal indoleamine melatonin. In: *Progress in Tryptophan and Serotonin Research*, B. Linzen, ed., Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York, 259-265, 1984
- Arendt, J.: Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 8, J.R. Clarke ed., Clarendon Press, Oxford, 1986
- Armengol, J.A., F.A. Prada and J.M. Genis-Galvez: Subsurface cisterns in the chick retina: a genesis starting from rough endoplasmic reticulum. *Morfologia Normal y Patologica* 7, 341-350, 1983
- Armstrong, S.M., V.M. Cassone, M.J. Chesworth, J.R. Redman and R.V. Short: Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J. Neural. Transm.* 21, 375-394, 1986
- Baccetti, B., E. Bigliardi, M.V. Talluri and A.G. Burrini: The Sertoli cells in lizards. *J. Ultrastruct. Res.* 85, 11-23, 1983
- Benson, B., B.R. Larson and P.R. Findell: Melatonin and other pineal products. In: *Melatonin: Current Status and Perspectives*, N. Birau and W. Schloot, eds., Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt, 55-64, 1980
- Le Beux, Y.J.: Subsurface cisterns and lamellar bodies: Particular forms of the endoplasmic reticulum in the neurons. *Z. Zellforsch.* 133, 327-352, 1972
- Blaustein, M.P.: Cellular Calcium: Nervous System. In: *Calcium in Human Biology*, B.E.C. Nordin, ed., Springer Verlag, London, Berlin, Heidelberg, New York, Paris, Tokyo, 339-366, 1988
- Bronton, D., S. Bullivant, N.G. Gilula, M.J. Karnovsky, H. Moer, K. Mühlethaler, D.H. Northcote, L. Packer, B. Satir, P. Satir, V. Speth, L.A. Staehlin, R.L. Steere and R.S. Weinstein: Freeze-etching nomenclature. *Science* 190, 54-56, 1975

- Brownell, W.E. and B. Kachar: Outer hair cell motility: A possible electro-kinetic mechanism. In: *Peripheral Auditory Mechanisms*, J.R. Allen, J.L. Hall, A.E. Hubbard, S.T. Neely and A. Tubis, eds., Springer-Verlag, New York, 369-376, 1986
- Brzin, M., V.M. Tennyson and P.E. Duffy: Acetylcholinesterase in frog sympathetic and dorsal root ganglia. *J. Cell Biol.* 31, 215-243, 1966
- Bulinski, J.C., J.E. Richards and G. Piperno: Posttranslational modification of a tubulin: Detyrosination and acetylation differentiate populations of interphase microtubules in cultured cells. *J. Cell Biol.* 106, 1213-1220, 1988
- Buzzell, G.R., J.G. Thoma, M.G. O'Brien and J. Haskins: Responses of the accessory sex glands of the Syrian hamster to castration, short-day photoperiods and pinealectomy. *Adv. Biosci.* 53, 115-120, 1984
- Campbell, A.K.: *Intracellular Calcium (Its universal role as regulator)*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, New York, 1983
- Carafoli, E. und J.T. Penniston: Das Calciumsignal. *Spektrum der Wissenschaft*, 76-86, Januar 1986
- Cardinali, D.P.: Molecular biology of melatonin: assessment of the "microtubule hypothesis of melatonin action". In: *Melatonin - Current Status and Perspectives*, N. Birau and W. Schloot, eds., Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt, 247-256, 1980
- Cardinali, D.P.: Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocrine Rev.* 2, 327-346, 1981
- Cardinali, D.P.: Neural-hormonal integrative mechanisms in the pineal gland and superior cervical ganglia. In: *The Pineal Gland*, R.J. Reiter, ed., Raven Press, New York, 83-107, 1984
- Champney, T.H., B.N. Joshi, M.K. Vaughan and R.J. Reiter: Superior cervical ganglionectomy results in the loss of pineal concretions in the adult male gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Anat. Rec.* 211, 465-468, 1985
- Collin, J.P.: Differentiation and regression of the cells of the sensory line in the epiphysis cerebri. In: *The Pineal Gland. A Ciba Foundation Symposium*, G.E.W. Wolstenholme and J. Knight, eds., Churchill Livingstone, Edinburgh, 79-120, 1971
- Collin, J.P.: Recent advances in pineal cytochemistry. Evidence of the production of indoleamines and proteinaceous substances by rudimentary photoreceptor cells and pinealocytes of amniota. In: *The Pineal Gland of Vertebrates including Man*. J.A. Kappers and P. Pévet, eds., Elsevier/North-Holland

- Collin, J.P.: New data and vistas on the mechanisms of secretion of proteins and indols in the mammalian pinealocyte and its phylogenetic precursors; the Pinealin hypothesis and preliminary comments on membrane traffic. In: The Pineal Organ: Photobiology-Biochronometry-Endocrinology, A. Oksche and P. Pévet eds., Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 187-196, 1982
- Craig, S. and L.A. Staehlin: High pressure freezing of intact plant tissues. Evaluation and characterization of novel features of the endoplasmic reticulum and associated membrane systems. *Eur. J. Cell Biol.* 46, 80-93, 1988
- Dabora, S.L. and M.P. Shéetz: The microtubule-dependent formation of a tubulovesicular network with characteristics of the ER from cultured cell extracts. *Cell* 54, 27-35, 1988
- Daya, S. and B. Potgieter: The effect of castration, testosterone and estradiol on ^{14}C -serotonin metabolism by organ cultures of male rat pineal glands. *Experientia*, 41, 275-276, 1985
- Dombrowski, T.A. and J.A. McNulty: Morphometric analysis of the pineal complex of the golden hamster over a 24 hour light:dark cycle: I. The superficial pineal in untreated and optical enucleated animals. *Amer. J. Anat.* 171, 359-368, 1984
- Duce, I.R. and P. Keen: Can neuronal smooth endoplasmic reticulum function as a calcium reservoir. *Neuroscience* 3, 837-848, 1978
- Dustin, P: General Physiology of Tubulins and Microtubules. In: Microtubules 2, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984
- Engström, H.: On the double innervation of the sensory epithelia of the inner ear. *Acta oto-laryng.* 49, 109-118, 1958
- Fiori, M.G. and E. Mugnaini: Subsurface and cytoplasmic cisterns associated with mitochondria in pyramidal neurons of the rat dorsal cochlear nucleus. *Neuroscience* 6, 461-471, 1981
- Fisher, S.K. and K. Goldman: Subsurface cisterns in the vertebrate retina. *Cell Tiss. Res.* 164, 473-480, 1975
- Foldes, A., C.A. Maxwell, R.J. Sacramuzzi, J.B. Donnelly, R.M. Hoskinson, A.J. Rintoul: Seasonal changes in the sensitivity of ovine pineal β -adrenoreceptors to steroids. *Neuroendocrinology* 41, 494-498, 1985
- Forbes, M., B.A. Plantholt and N. Sperelakis: Cytochemical staining procedures selective for sarcotubular system of muscle:

- Franke, W.W.: Cytoplasmic microtubules linked to endoplasmic reticulum with cross-bridges. Exp. Cell Res. 141, 139-147, 1971
- Freire, F. and D.P. Cardinali: Effects of melatonin treatment and environmental lighting on the ultrastructural appearance, melatonin synthesis, norepinephrine turnover and microtubule protein content of the rat pineal gland. J. Neural. Transm. 37, 237-257, 1975
- Fujimoto, S., K. Yamamoto, K.Kuba, K. Morita and E. Kato: Calcium localisation in the sympathetic ganglion of the bullfrog and effects of caffeine. Brain Res. 202, 21-32, 1980
- Furuse, T., Y. Iwasaki and N. Takahata: Interconnection of subsurface cisterns in mouse hippocampal pyramidal cells. Brain Res. 238, 401-403, 1982
- Goldman, B.D. and J.M. Darrow: The pineal gland and mammalian photoperiodism. Neuroendocrinology 37, 386-396, 1983
- Gonzalez-Brito, A., R.J. Reiter, M.G. Tannenbaum and D.J. Jones: Adrenalectomy but not gonadectomy affects rat pineal β -adrenergic receptor density. Neurosci. lett. 92, 330-334, 1988
- Goodenough, D.A. and J.P. Revel: A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. J. Cell Biol. 45, 272-290, 1970
- Grota, L., W. Holloway and G. Brown: Melatonin receptors in pineal. In: Melatonin - Current Status and Perspectives. N. Birau and W. Schloot, eds., Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Frankfurt, 257-261, 1980
- Gulley, R.L. and T.S. Reese: Freeze-fracture studies on the synapses in the organ of Corti. J. Comp. Neur. 171, 517-544, 1977
- Hama, K.: Some observations on the fine structure of the lateral-line organ of the Japanese sea eel, *Lyncozymba nystromi*. J. Cell Biol 24, 193-210, 1965
- Hannah, R.S. and E.J. Nathaniel: Ultrastructural studies on post-natal differentiation of neurons in the substantia gelatinosa of rat cervical spinal cord. Anat. Rec. 183, 323-338, 1978
- Heinzeller, Th.: Impact of psychosocial stress on pineal structure of male gerbils (*Meriones unguiculatus*). J. Pineal Research 2, 145-159, 1985

- Heinzeller, Th. und B. Aschauer: Untersuchungen am streßinvolvierten Thymus des Gerbils. Verh. Anat. Ges. 71, 657-658, 1987
- Heinzeller, Th., B.N. Joshi, F. Nürnberger and R.J. Reiter: Effects of aggressive encounters on pineal melatonin formation in male gerbils (*Meriones unguiculatus*, Cricetidae). J. Comp. Physiol. A 164, 91-94, 1988 a
- Heinzeller, Th. und I. Schinko: Elektronenmikroskopischer Vergleich der Pinealozyten von Kurz- und Langtagtieren des Dsungarischen Hamsters. Anat. Anz. Jena 147, 485, 1980
- Heinzeller, Th. and I. Tutter: Morphometry of subsurface cisterns in the pinealocyte of *Meriones unguiculatus* under various conditions. EPSG Newsletters Suppl. 7, 77, 1987
- Heinzeller, Th., I. Tutter und B. Aschauer: Einfluß von Tagesgang, Ganglionektomie und Kastration auf Zell- und Kernvolumen von Pinealozyten des Gerbils. Posterpräsentation, 1988 b
- Helland, L.A., J.R. Lopez, S.R. Taylor, G. Trube and L.A. Wanek: Effects of calcium "antagonists" on vertebrate skeletal muscle cells. Ann. New York Acad. Sci. 522, 259-268, 1988
- Henkart, M., D.M. Landis and T.S. Reese: Similarity of junctions between plasmamembranes and endoplasmic reticulum in muscle and neurons. J. Cell Biol. 70, 338-347, 1976
- Henkart, M.P., T.S. Reese and F.S. Brinley: Endoplasmic reticulum sequesters calcium in the squid giant axon. Science 202, 1300-1303, 1978
- Herndon, R.M.: The fine structure of the Purkinje cell. J. Cell Biol. 18, 167-180, 1963
- Hérvás, J.-P. and M. Lafarga: Subsurface cisterns in the paraventricular nuclei of the hypothalamus of the rat. Cell Tiss. Res. 199, 271-279, 1979
- Heym, C. and K. Addicks: Formation of perichromatin granules. Nematosomes and concentric lamellar bodies in sympathetic postganglionic perikarya in response to immobilization stress. Anat. Embryol. 165, 281-290, 1982
- Ho, A.K., C.L. Chik and D.C. Klein: Protein Kinase C is involved in adrenergic stimulation of pineal cGMP accumulation. J. Biol. Chem. 262, 10059-10064, 1987
- Ho, A.K. C.L. Chik and D.C. Klein: Permissive role of calcium in α 1-adrenergic stimulation of pineal phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C) activity. J. Pineal Res. 5, 553-564, 1988

- Ho, A.K. and D.C. Klein: Activation of α_1 -adrenoreceptors, protein kinase C, or treatment with intracellular free Ca^{2+} elevating agents increases pineal phospholipase A_2 activity. J. Biol. Chem. 262, 11764-11770, 1987
- Hong, S.M. and M.H. Stetson: Detailed diurnal rhythm of sensitivity to melatonin injections in Turkish hamsters *Mesocricetus brandti*. J. Pineal Res. 4, 69-78, 1987
- Huang, H.-T. and H.-S. Lin: Synaptic junctions between the adrenergic axon varicosity and the pinealocyte in the rat. J. Pineal Res. 1, 281-291, 1984
- Illnerova, H., M. Backström, J. Sääf, L. Wetterberg and B. Vangbo: Melatonin in rat pineal gland and serum: rapid parallel decline after light exposure at night. Neuroscience Letters 9, 189-193, 1978
- Ito, M. M. Kadekaro and L. Sokoloff: Local glucose utilization of the brain and pineal gland during stimulation of the cervical sympathetic trunk. J. Pineal Res. 5, 51-62, 1988
- Juillard, M.-T. and J.P. Collin: Pools of serotonin in the pineal gland of the mouse: The mammalian pinealocyte as a component of the diffuse neuroendocrine system. Cell Tiss. Res. 213, 273-291, 1980
- Karasek, M.: Ultrastructural study of the pineal-hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis in mammals. In: The Pineal Gland. Current State of Pineal Research, B. Mess, C. Ruzsas, L. Timá and P. Pévet, eds., Elsevier Science Publishers Amsterdam, New York, Oxford, 35-46, 1985
- Karasek, M., E.C. Hurlbut, J.T. Hansen and R.J. Reiter: Ultrastructure of pinealocytes of the kangaroo rat (*Dipodomys ordi*). Cell Tiss. Res. 226, 167-175, 1982
- Karasek, M., E. Karasek and H. Stepien: Effect of castration on the concentration of adenosine 3',5'-monophosphate in the rat pineal organ. J. Neural Transm. 42, 145-149, 1978
- Karasek, M. and K. Marek: Influence of gonadotropic hormones on the ultrastructure of rat pinealocytes. Cell Tiss. Res. 188, 133-141, 1978
- Karasek, M., L.J. Petterborg, T.S. King, J.T. Hansen and R.J. Reiter: Effect of superior cervical ganglionectomy on the ultrastructure of the pinealocyte in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*). Gen. comp. Endocrinology 51, 131-137, 1983
- Karnovsky, M.J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27, 137A, 1965

- Khaledpour, C. and L. Vollrath: Evidence for the presence of two 24-h rhythms 180° out of phase in the pineal gland of male Pirbright-White guinea pigs as monitored by counting "synaptic" ribbons and spherules. *Exp. Brain Res.* 66, 185-190, 1987
- King, T.S. and W.J. Dougherty: Effect of denervation on "synaptic" ribbon populations in the rat pineal gland. *J. Neurocytol.* 11, 19-28, 1982
- Klein, D.C.: Photoregulation of the mammalian pineal gland. In: *Photoperiodism, Melatonin and the Pineal*. CIBA Symposium 117, D. Evered and S. Clark, eds., Pitman, London, 51-56, 1985
- Kolde, G. and H. Themann: Subsurface cisterns and lamellar bodies in the granula cells of the guinea-pig fascia dentata. *Cell Tiss. Res.* 223, 455-461, 1982
- Korf, H.-W. and M. Møller: The innervation of the mammalian pineal gland with special reference to central pinealopetal projections. *Pineal Res. Rev.* 2, 41-86, 1984
- Krstić, R.: Ultrastructure of rat pineal gland after preparation by freeze-etching technique. *Cell Tiss. Res.* 148, 371-379, 1974
- Krstić, R.: Ultracytochemical localisation of calcium in the superficial pinealgland of the Mongolian gerbil. *J. Pineal Research* 2, 21-37, 1985
- Krstić, R.: Ultracytochemical evidence for the presence of GERL in pinealocytes of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Cell Tiss. Res.* 246, 583-588, 1986
- Kumegawa, M., M. Cattoni and G.G. Rose: Electron microscopy of oral cells in vitro. II. Subsurface and intracytoplasmic confronting cisternae in strain KB cells. *J. Cell Biol.* 36, 443-452, 1968
- Kurumado, K. and W. Mori: A morphological study of the circadian cycle of the pineal gland of the rat. *Cell Tiss. Res.* 182, 565-568, 1977
- Lee, C. and L.B. Chen: Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell* 54, 37-46, 1988
- Lin, H.-S., B.-H. Hwang and C.-Y. Tseng: Fine structural changes in the hamster pineal gland after blinding and superior cervical ganglionectomy. *Cell Tiss. Res.* 158, 285-299, 1975
- Llinas, R. and S.A. Greenfield: On-line visualization of dendritic release of acetylcholinesterase from mammalian substantia nigra neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3047-3050, 1987

- Lubitz, DKJ Ekström von: Subsurface tubular system in the outer sensory cells of the rat cochlea. *Cell Tiss. Res.* 220, 287-795, 1981
- Lukaszyk, A. and R.J. Reiter: Histophysiological evidence for the secretion of polypeptides by the pineal gland. *Am. J. Anat.* 143, 451-464, 1975
- Lynch, H.J. and M.-H. Deng: Pineal response to stress. *J. Neural Transmiss. Suppl.* 21, 461-473, 1986
- Malaisse, N.J.: Cellular Calcium: Secretion of hormones. In: *Calcium in Human Biology*, B.E.C. Nordin, ed., Springer Verlag, London, Berlin, Heidelberg, New York, Paris, Tokyo, 367-384, 1988
- Masson-Pévet, M., P. Pévet and Hub P.J.M. Noteborn: Ultrastructural demonstration of exocytosis in the pineal gland. *J. Pineal Res.* 4, 61-68, 1987
- Matsushima, S., Y. Morisawa, I. Aida and K. Abe: Circadian variations in pinealocytes of the Chinese hamster, *Cricetulus griseus*. *Cell Tiss. Res.* 228, 231-244, 1983
- McGraw, C.F., A.V. Somlyo and M.P. Blaustein: Localisation of Calcium in presynaptic nerve terminals. *J. Cell Biol.* 85, 228 - 241, 1980
- McKee, M.D. and H. Warshawsky: Quantitative Analysis of rough endoplasmic reticulum approaches to the cell membrane in the secretory ameloblast of the rat incisor. *Anat. Rec.* 209, 289-295, 1984
- McLaughlin, B.J.: The fine structure of neurons and synapses in the motor nuclei of the cat spinal cord. *J. Comp. Neur.* 144, 429-460, 1972
- Miller, R.H., R.J. Lasek and M.J. Katz: Preferred microtubules for vesicle transport in lobster axons. *Science* 235, 220-222, 1987
- Mitchison, T. and M. Kirschner: Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242, 1984
- Møller, M.: Non-sympathetic synaptic innervation of the pinealocyte of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): An electron microscopic study. *J. Neurocytol.* 14, 541-550, 1985
- Møller, O.J., O.O. Thomsen and J.A. Larsen: The existence of tubulo-cisternal endoplasmic reticulum in the rat hepatocytes. *Cell Tiss. Res.* 228, 13-20, 1983
- Møllgard, K. and N.R. Saunders: A possible transepithelial pathway via endoplasmic reticulum in foetal sheep choroid

- plexus. Proc. R. Soc. Lond. 199, 321-326, 1977
- Moore, R.Y.: The innervation of the mammalian pineal gland. Progr. reprod. Biol. 4, 1-29, 1978
- Morré, D.J. and L. Ovtracht: Structure of rat liver Golgi-apparatus: Relationship to lipoprotein secretion. J. Ultrastruct. Res. 74, 284-295, 1981
- Niles, L.P.: Melatonin binding in brain membranes and effects on adenylat cyclase. Soc. Neurosci. 9, 729, 1983
- Novikoff, A.B.: The endoplasmic reticulum: A cytochemist's view (a review). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2781-2787, 1976
- Novikoff, A.B. and P.M. Novikoff: Cytochemical contributions to differentiating GERL from the Golgi-apparatus. Histochemistry 9, 525-551, 1977
- Nuñez, E.A.: The occurrence of organelle-associated intercellular junctions during late hibernation. Am. J. Anat. 131, 227-240, 1971
- Nyby, J. and D. Del Thiessen: Singular and interactive effects of testosterone and estrogen on territorial marking in castrated Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). Hormone Behav. 2, 279-285, 1987
- Pannese, E., L. Luciano, S. Iurato and E. Reale: The localisation of Acetylcholinesterase activity in the spinal ganglia of the adult fowl, studied by electron microscope histochemistry. Histochemistry 39, 1-13, 1974
- Pavelka, M.: Functional morphology of the Golgi apparatus. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. 106, 1-94, 1987
- Peachey, L.D.: Thin sections I. A study of section thickness and physical distortion produced during microtomy. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 233-242, 1958
- Perissel, B., P. Malet and A. Geneix: Associations jonctions-organites cellulaires dans le foie néo-natal de souris. Z. Zellforsch. 140, 77-89, 1973
- Peschke, E., D. Peschke, J. Peil, C. Ruzsas and B. Mess: Changes in the daily rhythm of serum testosterone levels following superior cervical sympathetic ganglionectomy in the cold-exposed rat: The role of the pineal. J. Pineal Res. 5, 179-189, 1988
- Peteghem, M.C. van and M.M. Mareel: Confronting subsurface cisternae and desmosomes in HeLa monolayer cultures. Cell Biol. Intern. Reports, 2, 5, 1978

- Pévet, P.: Secretory processes in the mammalian pinealocyte under natural and experimental conditions. In: The Pineal Gland of Vertebrates including Man, J.A. Kappers and P. Pévet, eds., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, 149-194, 1979
- Pévet, P.: Peptides in the pineal gland of vertebrates. Ultrastructural, histochemical, immunocytochemical and radio-immunological aspects. In: The Pineal Organ, Photobiology - Biochronometry - Endocrinology, A. Oksche and P. Pévet, eds., Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 211-236, 1982
- Pévet, P.: 5-Methoxyindoles, pineal peptides and reproduction. In: The Pineal Gland: Endocrine Aspects, G.M. Brown and S.D. Wainwright, eds., Pergamon Press, Toronto, 83-102, 1985
- Pévet, P. and J.-P. Collin: Les pinealocytes de Mammifère: Diversité, homologues, origine. Etude chez la Taupe adulte (*Talpa europaea* L.). J. Ultrastruct. Res. 57, 22-31, 1976
- Piezzzi, R.S. and J.C. Cavicchia: Effect of cold and melatonin on the microtubules of the toad sciatic nerve. Anat. Rec. 200, 115-120, 1981
- Pizarro, M.D.L., J.A. Gil, J. L. Vasallo, and L. Munoz Barragan: Rat pineal gland calcium distribution. Chin. J. Physiol. Sci. 4, 267, 1988
- Poffenbarger, M. and G.M. Fuller: Is melatonin a microtubule inhibitor? Exp. Cell Res. 103, 135-141, 1976
- Prevedello, M.R., M.N. Ritta and D.P. Cardinali: Fast axonal transport in rat sciatic nerve. Inhibition by pineal indoles. Neurosci. Lett. 13, 29-34, 1979
- Putney, J.W.: A model for receptor-regulated Calcium entry. Cell Calcium 7, 1-12, 1986
- Rambourg, A., Y. Clermont and L. Hermo: Three-dimensional architecture of the Golgi apparatus in Sertoli cells of the rat. Amer. J. Anat. 154, 455-476, 1979
- Rambourg, A. and Y. Clermont: Tridimensional structure of the Golgi apparatus in type A ganglion cells of the rat. Amer. J. Anat. 176, 393-409, 1986
- Raphael, Y. and R. Wróblewski: Linkage of sub-membrane cisterns with the cytoskeleton and the plasma membrane in cochlear outer hair cells. J. Submicrosc. Cytol. 18, 731-737, 1986
- Rasmussen, H., I. Kojima, K. Kojima, W. Zawalich and W. Apfeldorf: Calcium as intracellular messenger: Sensitivity modulation, C-Kinase pathway and sustained cellular

- response. *Adv. Cycli Nucleotide Res.* 18, 159-193, 1984
- Raviola, E. and G. Raviola: Subsurface cisterns in the amacrine cells of the rabbit retina. *J. Submicr. Cytol.* 1, 35-42, 1969
- Reiter, R.J.: Comparative physiology: Pineal gland. *Ann. Rev. Physiol.* 35, 305-328, 1973
- Reiter, R.J.: The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrin. Rev.* 1, 109-131, 1980
- Reiter, R.J.: The melatonin message: Duration versus coincidence hypothesis. *Life Sci.* 40, 2119-2131, 1987
- Reiter, R.J., E.C. Hurlbut, A.I. Esquefino, T.H. Champney and R.W. Steger: Changes in Serotonin levels, N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity and melatonin levels in the pineal gland of the Richardson's ground squirrel in relation to the light-dark cycle. *Neuroendocrinology* 39, 356-360, 1984
- Reiter, R.J., M.G. Welsh and M.K. Vaughan: Age-related changes in the intact and sympathetically denervated gerbil pineal gland, *Amer. J. Anat.* 146, 427-432, 1976
- Reuss, S.: Effects of chemical and surgical ganglionectomy on electrical activity of the pineal gland of male rats. *J. Pineal Res.* 3, 87-94, 1986
- Reyners, H., E. Gianfelici de Reyners, J. van der Parren et J.-R. Maisin: Étude morphométrique des citernes submembranaires des neurones et de leurs relations spatiales avec les processus astroglaires dans le cortex cérébral du rat. *Biol. Cellulaires* 30, 265-278, 1977
- Rominj, H.J.: The ultrastructure of the rabbit pineal gland after sympathectomy, parasympathectomy, continuous illumination and continuous darkness. *J. Neural Transm.* 36, 183-194, 1975
- Rominj, H.J. M.T. Mud and P.S. Wolters: Diurnal variations in number of golgi-dense core vesicles in light pinealocytes of the rabbit. *J. Neural Transm.* 38, 231-237, 1976
- Rodriguez, E.M., H.-W. Korf, A. Oksche, C.R. Yulis and S. Hein: Pinealocytes immunoreactive with antisera against secretory glycoproteins of the subcommissural organ: A comparative study. *Cell Tiss. Res.* 254, 469-480, 1988
- Romero, J.A. and J. Axelrod: Pineal β -adrenergic receptor: diurnal variation in sensitivity. *Science* 184, 1091-1092, 1974

- Rosenbluth, J.: Subsurface cisterns and their relationship to the neuronal plasma membrane. *J. Cell Biol.* 13, 405-421, 1962
- Roth, J., D.J. Taatjes, J.M. Lucocq, J. Weinstein and J.C. Paulson: Demonstration of an extensive trans-tubular network continuous with the golgi apparatus stack that may function in glycosylation. *Cell* 43, 287-295, 1985
- Sachs, L.: *Angewandte Statistik: statistische Methoden und ihre Anwendung*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978
- Saito, K.: Fine structure of the sensory epithelium of guinea-pig organ of Corti: Subsurface cisternae and lamellar bodies in the outer hair cells. *Cell Tiss. Res.* 229, 467-481, 1983
- Salzmann, R.C.: Beiträge zur Fortpflanzungsbiologie von *Meriones shawi*. Dissertation, Philos.-Naturwiss. Fakultät der Univ. Basel, 1963
- Samarasinghe, D.D., L.J. Petterborg, J.W. Zeagler, K.M. Tiang and R.J.Reiter: On the occurrence of a myeloid body in pinealocytes of the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. *Cell Tiss. Res.* 228, 649-659, 1983
- Schlaepfer, W.W. and U.-J. P. Zimmerman: Calcium-activated protease and the regulation of the axonal cytoskeleton. In: *Axonal Transport in Neuronal Growth and Regeneration*. J.S. Elam and P. Cancalon eds., Plenum Press, New York, London, 261-273, 1984
- Schliwa, M.: Mechanisms of intracellular organelle transport. In: *Cell and Muscle Motility 5*, J.W. Shay ed., Plenum Press, New York, 1-82, 1984
- Siegesmund, K.A.: The fine structure of subsurface cisterns. *Anat. Rec.* 162, 187-196, 1968
- Somlyo, A.: Cellular site of calcium regulation. *Nature* 309, 516-517, 1984
- Soriano, F., H.A. Welker and L. Vollrath: Correlation of the number of pineal "synaptic" ribbons and spherules with the level of serum melatonin over a 24-hour period in male rabbits. *Cell Tiss. Res.* 236, 555-560, 1984
- Špaček, J.: "Free" postsynaptic-like densities in normal adult brain: Their occurrence, distribution, structure and association with subsurface cisterns. *J. Neurocytology* 11, 693-706, 1982
- Špaček, J. and A.R. Lieberman: A specific and striking intercellular association between "free" postsynaptic-like densities and subsurface cisterns in the brain of normal adult

- Stetson, M.H. and M. Watson-Whitmyre: Physiology of the pineal and its hormone melatonin in annual reproduction in rodents. In: The Pineal Gland, R.J. Reiter ed., Raven Press, New York, 109-153, 1984 Transm. 21, 55-80, 1986
- Suarez, I., B. Fernandez and C.F. Ardavin: Lamellar body-subsurface cistern complexes in the paraventricular nuclei of the hamster. J. Submicrosc. Cytol. 15, 941-950, 1983
- Takahashi, K. and R.L. Wood: Subsurface cisterns in the Purkinje cells of cerebellum of Syrian hamster. Z. Zellforsch. 110, 311-320, 1970
- Tandler, B. and Ch.C. Hoppel: Subsurface cisterns in Mouse Hepatocytes. Anat. Rec. 179, 273-284, 1974
- Taugner, R., A. Schiller and R. Rix: Gap junctions between pinealocytes. Cell Tiss. Res. 218, 303-314, 1981
- Terasaki, M., L.B. Chen and K. Fujiwara: Microtubuli and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. J. Cell Biol. 103, 1557-1568, 1986
- Theron, J.J., R.P. Biagio and C.H. Henning: Circadian changes in the ultracytochemical localization of calcium in the pinealocytes of the baboon (*Papio ursinus*). Chin. J. Physiol. Sci. 4, 280, 1988
- Thiessen, Del and P. Yahr: The Gerbil in Behavioral Investigations. Univ. of Texas Press, Austin, London, 1977
- Turek, F.: Role of the pineal gland in photoperiod-induced changes in hypothalamic-pituitary sensitivity to testosterone feedback in castrated male hamsters. Endocrinology 104, 636-640, 1979
- Ungar, F., I. Piscopo, J. Letitia and E. Holtzman: Uptake of calcium by the endoplasmic reticulum of frog photoreceptor. J. Cell Biol., 1984
- Vale, R.D. and H. Hotani: Formation of membrane networks in vitro by kinesin-driven microtubule movement. J. Cell Biol. 107, 2233-2241, 1988
- Vacas, M.I. and D.P. Cardinali: Binding sites for melatonin in bovine pineal gland. Horm. Res. 13, 121-131, 1980
- Vaughan, M.K., G.M. Vaughan, D.E. Blask and R.J. Reiter: Influence of melatonin, constant light, or blinding on reproductive system of gerbils (*Meriones unguiculatus*). Experientia 32, 1341, 1976,

- Voss, Ch., A. Schiller and R. Taugner: Morphology and Distribution of the synapses to the spinal motoneuron of the frog. With special references to the ssc. *Cell Tiss. Res.* 213, 253-271, 1980
- Vollrath, L.: Synaptic ribbons of a mammalian pineal gland. Circadian changes. *Z. Zellforsch.* 145, 171-183, 1973
- Vollrath, L.: The Pineal Organ. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, VI, A. Oksche, L. Vollrath, eds., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1981
- Wagner, U.: Nervous connections between the pineal complex and the brain stem in *Lacerta s.sicula* Rafinesque and *Cavia cobaya*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen, 1982
- Wakasugi, H., T. Kimura, W. Haase, A. Kribben, R. Kaufmann and I. Schulz: Calcium uptake into rat acini from pancreas: Evidence for intracellular ATP-dependant calcium sequestration. *J. Membrane Biol.* 65, 205-220, 1982
- Waldhauser, F. and H. Steger: Changes in melatonin secretion with age and pubescence. *J. Neural Transm. Suppl.* 21, 183-197, 1986
- Walz, B.: Ca^{2+} -sequestering smooth endoplasmic reticulum in an invertebrate photoreceptor I. Intracellular topography as revealed by OsFeCN staining and in situ calcium accumulation. *J. Cell Biol.* 93, 839-848, 1982
- Walz, B.: Ca^{2+} -Sequestering smooth endoplasmic reticulum in an invertebrate photoreceptor. II. Its properties as revealed by microphotometric measurements. *J. Cell Biol.* 93, 849-859, 1982
- Wassermann, R.H.: Cellular calcium: Action of hormones. IN: *Calcium in Human Biology*, B.E.C. Nordin, ed., Springer Verlag, London, Berlin, Heidelberg, New York, Paris, Tokyo, 385-419, 1988
- Watanabe, H.: The organisation and fine structure of autonomic ganglia of amphibia. In: *Autonomic Ganglia*, E. Lars-Gösta ed., 183-201, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, N.Y., Brisbane, Toronto, Singapore, 1983
- Watanabe, H. and G. Burnstock: Postsynaptic specializations at excitatory and inhibitory cholinergic synapses. *J. Neurocytol.* 7, 119-133, 1978
- Weis, P.: Confronting subsurface cisternae in chick embryo spinal ganglia. *J. Cell Biol.* 39, 485-488, 1968

- Weiss, L.; Cell and Tissue Biology. A Textbook of Histology. L. Weiss ed., Urban & Schwarzenberg, Baltimore, München, 1988
- Weiss, D.G., F. Keller, J. Gulden and W. Maile: Towards a new classification of intracellular particle movements based on quantitative analyses. Cell Motil. Cytoskel. 6, 128-135, 1987
- Welker, H.A. and L. Vollrath: Melatonin formation in different parts of the guinea-pig pineal complex as assessed over 24 hours. J. Neural Transm. 63, 315-326, 1985
- Welsh, M.G.: Cytochemical analysis of calcium distribution in the superficial pineal gland of the Mongolian gerbil. J. Pineal Res. 1, 305-316, 1984
- Welsh, M.G., I.L. Cameron and R.J. Reiter: The pineal gland of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) II. Morphometric analysis over a 24-hour period. Cell Tiss. Res. 204, 95-109, 1979 a
- Welsh, M.G., J.T. Hansen and R.J. Reiter: The pineal gland of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) III. Morphometric analysis and fluorescence histochemistry in the intact and sympathetically denervated pineal gland. Cell Tiss. Res. 204, 111-125, 1979 b
- Welsh, M.G. and R.J. Reiter: The pineal gland of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) I. An ultrastructural study. Cell Tiss. Res. 193, 323-336, 1978
- Wick, S.M. and P.K. Hepler: Selective localization of intracellular Ca^{2+} with potassium antimonate (Review). J. Histochem. Cytochem. 30, 1190-1204, 1982
- Wilkinson, M.: The sensitivity of pineal gland beta-receptors appears to be dependent upon calcium ions. Pflügers Arch. 373, 209-210, 1978 1978.

Danksagung

Dem Betreuer meiner Arbeit, Herrn Prof. Dr.rer.nat. Th. Heinzeller, danke ich für die Überlassung des Themas und besonders herzlich für seine rege Anteilnahme am Fortgang meiner Arbeit und das freundliche Arbeitsklima. Ohne seine ständige Bereitschaft zu weiterführenden Diskussionen und seine vielfältigen Unterstützungen wäre die Arbeit in dieser Form nicht zu Stande gekommen.

Für die kritische Durchsicht der Arbeit und die Vertretung vor der Fakultät bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr.rer.nat. G. Neuweiler.

Dem Vorstand der Anatomischen Anstalt (Lehrstuhl III für Neuroanatomie und Embryologie) Herrn Prof. Dr.med. W. Lange danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und Herrn Prof. Dr.Dr. U. Welsch (Lehrstuhl II) für die finanzielle Unterstützung durch Beschäftigung in seinem Labor seit Juni 1988.

Bei Frau B. Aschauer, die für mich eine wertvolle und freundliche Unterstützung in allen technischen Fragen, v.a. bei der Einweisung in die Technik des Ultradünnschneidens, und bei der Herstellung der Graphiken war, bedanke ich mich sehr herzlich.

Viele Mitarbeiter der Anatomischen Anstalt standen mir immer wieder hilfreich zur Seite, vor allem Frau Dr. I. Schinko bei meinen Arbeiten am TEM und Frau Dr. I. Noske, die immer zu Diskussionen bereit war. Sehr herzlich danke ich Herrn H. Ruß für seine überaus gelungene graphische Aufarbeitung meiner Computerrekonstruktion.

Bei den Herren Prof. Dr. H. Holländer (MPI, Martinsried), Dr. P. Seifert (Zoologisches Institut, München) und Prof. Dr. L. Bachmann (Inst. für technische Chemie, Garching) bedanke ich mich für die Erlaubnis zur Benutzung ihrer technischen Einrichtungen. Eine große Hilfe waren die Ratschläge von Herrn Prof. Dr. R. Krstić (Lausanne) bei der Beurteilung der Aufnahmen von den Gefrierätzpräparaten.

Durch eine langfristige und unkomplizierte Leihgabe erleichterte mir die Firma Kontron (Eching) die Arbeiten am Bildanalysegerät. Für die Bereitstellung des Wirkstoffes Dantrolen danke ich der Firma Rhöm (Weiterstadt), der Firma Philips (Eindhoven) für die Durchführung der Elementanalysen.

Die Arbeit wurde von Mai 1985 - Mai 1988 durch ein Stipendium des Freistaates Bayern gefördert (Bayerisches Gesetz zur Förderung des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses); ich bedanke mich bei den Damen und Herren des Stipendienreferates, die mich in dem Förderzeitraum betreuten.

Lebenslauf

Name: Ilse Tutter

Adresse: Heinrich-Stieglitz-Kehre 7, 8000 München 70

21.12.1955 geboren in München

Eltern: Maria Tutter, Gymnasial-Lehrerin

Vinzenz Tutter, Dr.oec.publ., Dipl.Math.

11. 7.1977 Heirat mit Dieter Seitz-Tutter, Dipl.Biol.

1961 - 1965 Volksschule in München

1965 - 1975 Neusprachliches Gymnasium in München

Juni 1975 Abitur

Febr. 1976 Ausbildung zur Tierarzthelferin

Juli 1977 Abschlußprüfung vor der Bayerischen
Landestierärztekammer

Okt. 1977 Beginn des Biologiestudiums an der Ludwig-
Maximilians-Universität, München

Juli 1982 Mündliche Diplom-Biologen-Hauptprüfung in den
Fächern Zoologie, Systematische Botanik und
Paläontologie

Okt. 1984 Diplom, Thema der Diplomarbeit im Fach Zoologie:
"Untersuchungen zur Morphologie der Tergittaschen-
drüsen der Bienenkönigin (*Apis mellifica*, L.)";
Betreuer: Prof. Dr.rer.nat. M. Renner.

Okt. 1984 Beginn der Dissertationsarbeit im Fach Zoologie an
der Anatomischen Anstalt (LMU, München) unter der
Betreuung von Prof. Dr.rer.nat. Th. Heinzeller;
Thema: "Die "subsurface cisterns" an der Pinealo-
zytenmembran von *Meriones unguiculatus* (Cricetidae)
unter natürlichen und experimentellen Bedingungen".

Mai 1985 Stipendium des Freistaates Bayern (Bayerisches
- Mai 1988 Gesetz zur Förderung des wissenschaftlichen und
künstlerischen Nachwuchses)

Juni 1988 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Anatomischen
- Dez. 1988 Anstalt.

seit Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der

Mai 1989 1. Universitäts Frauenklinik (LMU, München).

